

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio del reconocimiento y de la respuesta inmune frente a lípidos de polen por células iNKT

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Abós Gracia

Directores

Eduardo Martínez Naves
Manuel María Gómez del Moral Martín Consuegra

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DEL RECONOCIMIENTO Y DE LA
RESPUESTA INMUNE FRENTE A LÍPIDOS DE POLEN
POR CÉLULAS iNKT**

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ ABÓS GRACIA

MADRID, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DEL RECONOCIMIENTO Y DE LA
RESPUESTA INMUNE FRENTE A LÍPIDOS DE POLEN
POR CÉLULAS iNKT**

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ ABÓS GRACIA

MADRID, 2012

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL RECONOCIMIENTO Y DE LA
RESPUESTA INMUNE FRENTE A LÍPIDOS DE POLEN
POR CÉLULAS iNKT**

AUTORA: Beatriz Abós Gracia

DIRECTORES: Dr. Eduardo Martínez Naves
Dr. Manuel María Gómez del Moral Martín Consuegra

LUGAR DE REALIZACIÓN: Área de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
MADRID

Firma del doctorando
de la Tesis

VºBº Director de la Tesis

VºBº Director

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

2012



A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que han formado parte de esta etapa de mi vida:

A Eduardo y Manolo, que me acogieron en su grupo y me enseñaron y guiaron hasta el final. Gracias por vuestra formación y por vuestro apoyo.

A todos los profesores del Departamento: Manolo, José Ramón, Edgar, Esther, Pedro, María José, Mercedes. Gracias por vuestra ayuda, consejos y sugerencias.

A todos mis compañeros, becarios y estudiantes (Juan, Vanesa, Elena M, Jesús, Couso, M^a José, Carmen, Bea, Miguel, Iria, Ana A, Noe, Vero, Alberto, Elena R, Santi, Rocío, Óscar, Javi, Diego, Arturo, Marta, Sabela, Perce, Marina, Patri, Ana, Miriam, Dani, Bea G, los Pajaritos...) realmente habéis hecho que este periodo de mi vida fuera inolvidable y estuviera lleno de risas y buenos momentos. Por vuestra ayuda en el laboratorio y en el ordenador, por los cafés, las sobremesas, las reuniones ilegales, los congresos, las celebraciones, las excursiones...

A Juan y Vanesa, que son los mejores “compis” que podría haber tenido.

A Mayte y Lourdes de la Facultad de Químicas por su colaboración y consejos.

A Julien del CBM, con el que he aprendido mucho.

A Jose Manuel, Juani y Rosi, sin vosotros el laboratorio no sería lo mismo.

Al grupo de las cervezas de los viernes. Sois mi mejor recuerdo del “labo” así que espero que siga habiendo muchos viernes.

A mis nuevos compañeros del CISA.

A mis amigos, por sus ánimos.

A mi hermano Héctor y a Pilar, por su apoyo.

A Adrien, por aguantarme cada día.

A mis padres, por estar siempre ahí.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Sistema CD1.	7
2. Células dendríticas y macrófagos.	23
3. Células NKT tipo I o invariantes.	25
4. Papel de las células NKT en alergia y asma.....	31
OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. Separación de lípidos de polen de olivo (<i>Olea europaea</i>).	49
2. Aislamiento de monocitos y diferenciación a células dendríticas y/o macrófagos. Tratamiento con extractos lipídicos derivados del polen de olivo.	52
3. Expansión y aislamiento de células iNKT ($V\alpha 24^+ V\beta 11^+$).	55
4. Anticuerpos utilizados.....	56
5. PCR cuantitativa a tiempo real.....	58
6. Ensayos funcionales.....	61
7. Análisis estadísticos.	64
RESULTADOS	67
1. La fracción lipídica del polen de olivo (<i>Olea europaea</i>) es capaz de activar células iNKT humanas in vitro.....	67
2. Los granos de polen de olivo son capaces de interaccionar e inducir cambios fenotípicos en DCs derivadas de monocitos.	69
3. Efecto de los lípidos procedentes del polen del olivo sobre monocitos, linfocitos B y células derivadas in vitro de monocitos: células dendríticas (DC) y macrófagos ($M\phi$). ...	72
4. Los lípidos del polen de olivo inducen síntesis de novo de CD1d en DCs.	90
5. Las células iNKT responden frente a iDCs tratadas con la fracción lipídica del polen de olivo.....	98
6. Análisis y separación de los componentes lipídicos del polen del olivo y efecto sobre las iDCs derivadas de monocitos.....	105

7. Estudio de la activación de células iNKT por las iDCs tratadas con las fracciones lipídicas aisladas del polen de olivo.	118
--	-----

DISCUSIÓN..... 123

1. Lípidos totales del polen de olivo (<i>Olea europaea</i>) son capaces de activar células iNKT humanas de sangre periférica.	123
2. Efecto de los extractos lipídicos procedentes del polen de olivo sobre monocitos, células dendríticas (DCs) y macrófagos ($M\phi$) derivados de monocitos y linfocitos B.	125
3. El aumento en la expresión de CD1d inducido por los lípidos del polen de olivo es dependiente de la activación del factor de transcripción PPAR- γ	128
4. Las células iNKT son capaces de responder frente a DCs tratadas con lípidos totales del polen de olivo.....	130
5. Activación de las células iNKT frente a lípidos de polen: influencia en alergia y asma.	132
6. Efecto de los distintos componentes lipídicos del polen de olivo sobre las DCs y sobre la activación de células iNKT.	134

CONCLUSIONES..... 141

ABREVIATURAS 145

BIBLIOGRAFÍA..... 151

ANEXOS..... 177

RESUMEN

RESUMEN

CD1d es una molécula de tipo MHC no polimórfica que presenta antígenos de naturaleza lipídica, tanto endógenos como exógenos, a células NKT (Natural Killer T). Las células NKT invariantes (iNKT) poseen un TCR $\alpha\beta$ muy conservado (V α 24/V β 11, en humanos) y expresan marcadores de células NK. Estas células tienen una gran capacidad de producir citoquinas Th1 y Th2, por lo que se les atribuyen funciones reguladoras de la respuesta inmune. Se ha descrito la participación de las células iNKT en reacciones alérgicas y en asma tanto en modelos animales como en humanos. Sin embargo, se desconoce mucho acerca de los mecanismos que subyacen a estas respuestas y sobre la naturaleza de los antígenos lipídicos reconocidos por las células iNKT. Por ello, en este trabajo estudiamos el reconocimiento y la respuesta de células iNKT frente a lípidos de polen de olivo (*Olea europeae*) presentados por CD1d.

En nuestro estudio mostramos la activación y proliferación de células iNKT frente a los lípidos del polen de olivo. Los lípidos del polen fueron capaces de incrementar la expresión de CD1d en distintos modelos de células presentadoras de antígeno, incrementando la respuesta citotóxica y la secreción de IFN- γ e IL-4 por las células iNKT. Estos resultados sugieren un posible mecanismo de activación de las células iNKT frente a lípidos de polen que puede ser relevante en las respuestas alérgicas.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Sistema CD1.

1.1. Características genéticas.

El sistema inmunitario genera poblaciones de células T muy diversas, con receptores antigénicos (TCRs) variables, que permiten el desarrollo de respuestas específicas adaptativas frente a una gran variedad de agentes patógenos. Las células T reconocen clásicamente péptidos antigénicos presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y clase II (MHC). Pero también existen poblaciones de células T activadas por antígenos lipídicos y glicolipídicos que son presentados por la familia de moléculas presentadoras de antígeno, CD1. Las moléculas CD1 son moléculas MHC de clase I no clásicas que aunque tienen un polimorfismo limitado son capaces de unir un amplio repertorio de lípidos derivados de patógenos o de tejidos propios y presentarlos a linfocitos T.

La familia de proteínas CD1 humanas se encuentra codificada por cinco genes (CD1A, -B, -C, -D y -E) muy poco polimórficos y estrechamente asociados entre sí en el cromosoma 1, en la región q23.1 (Calabi, Jarvis et al. 1989) (Ver Fig. 1). Estos genes codifican para cada una de las proteínas CD1: CD1a, -b, -c, -d y -e; y tienen una estructura de intrones/exones similar a los genes MHC de clase I. Las proteínas CD1 son proteínas integrales de membrana con 3 dominios extracelulares: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, que presentan un alto grado de similitud con las moléculas MHC de clase I clásicas (Martin, Calabi et al. 1987) (Longley, Kraus et al. 1989).

Los genes y proteínas CD1 han sido identificados en multitud de mamíferos, reflejando su conservación a lo largo de la evolución (MacHugh, Bensaid et al. 1988) (Hopkins and Dutia 1991) (Calabi, Belt et al. 1989) (Bradbury, Belt et al. 1988).

Atendiendo a la homología de nucleótidos y a la secuencia de aminoácidos se han clasificado los genes y proteínas CD1 en dos grupos, denominados como grupo I (CD1a, -b y -c) y grupo II (CD1d) (Calabi, Jarvis et al. 1989). CD1e quedaría en un lugar intermedio entre los dos grupos anteriores puesto que presenta características

particulares: se expresa de forma intracelular en células dendríticas (DCs) y su acción es mediar la carga de antígenos lipídicos en la molécula CD1b (Angenieux, Fraiser et al. 2005).

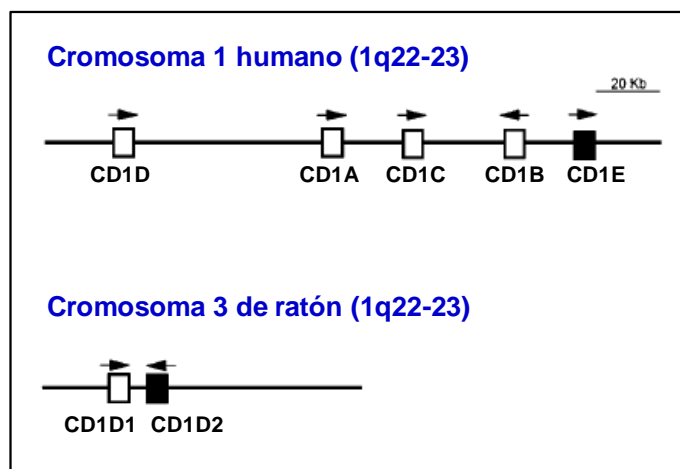


Figura 1. Organización cromosómica de los genes CD1 humanos y murinos.

Los ratones y ratas sólo poseen genes ortólogos de CD1D (CD1d1 y CD1d2), carecen de moléculas CD1 del grupo I y CD1e (Bradbury, Belt et al. 1988) (Balk, Bleicher et al. 1991) (Ichimiya, Matsuura et al. 1993) (Matsuura, Hashimoto et al. 1997). Por el contrario, en bovinos existen múltiples genes que codifican para las moléculas CD1 del grupo I y CD1e, pero no poseen genes funcionales para el grupo II. (Bricard and Porcelli 2007) (Van Rhijn, Koets et al. 2006).

En definitiva, se puede afirmar que el sistema CD1 precede a los mamíferos y ha sido conservado a lo largo de la evolución, lo que indica que estas moléculas llevan a cabo importantes funciones en el sistema inmunitario de los mamíferos y posiblemente de otros vertebrados.

1.2. Estructura proteica de las moléculas CD1.

Las proteínas CD1 se expresan como heterodímeros compuestos por la cadena pesada α (con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) unida de forma no covalente a la molécula β_2 -microglobulina (β_2 -m) (Hava, Brigl et al. 2005). Tras la síntesis en el retículo endoplasmático rugoso (RER) las proteínas CD1 sufren un proceso de maduración en el que la cadena α es glicosilada e interacciona con distintas chaperonas para su correcto plegamiento (calnexina, calreticulina, ERp57). A

continuación, se asocia con la cadena $\beta 2$ -m que estabiliza el complejo (Sugita, Porcelli et al. 1997) (Huttinger, Staffler et al. 1999) (Kang and Cresswell 2002).

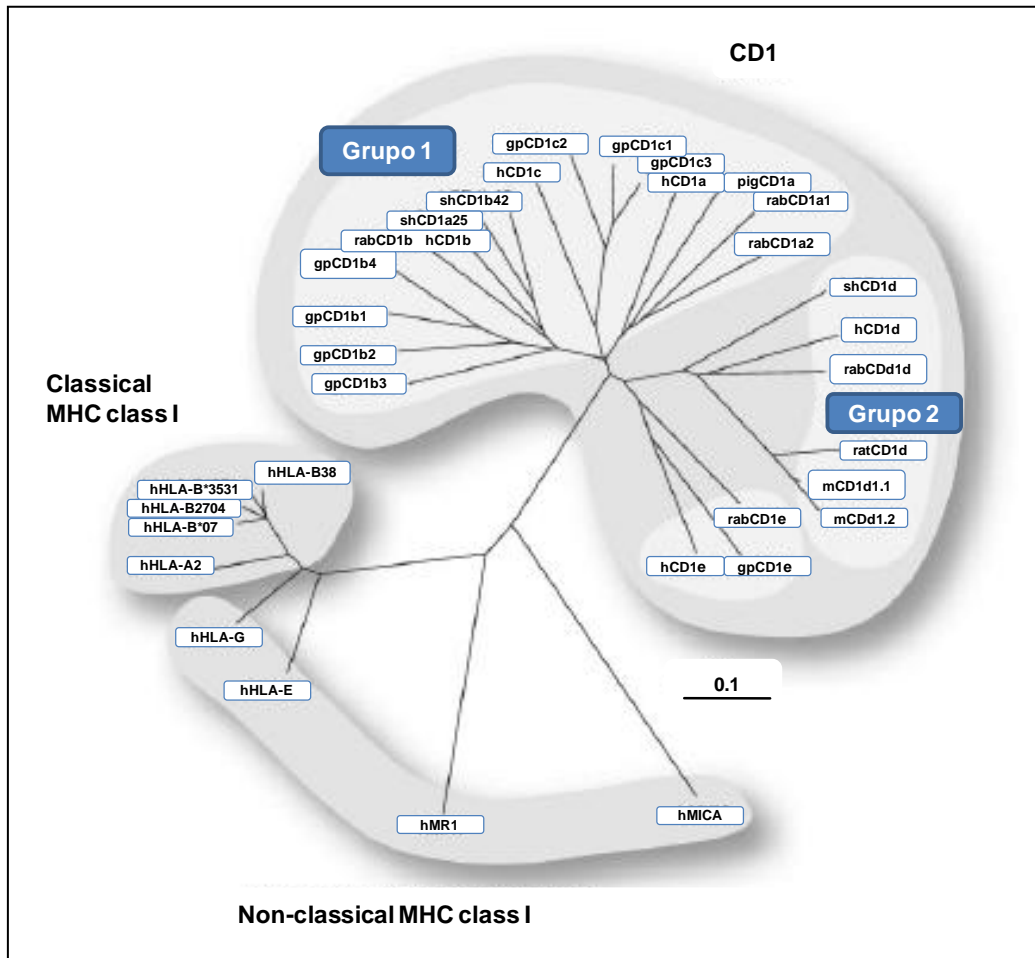


Figura 2. Árbol filogenético de la familia MHC de clase I. (Adaptado de Brigl y Brenner, 2004.)

Se ha determinado la estructura por cristalografía de rayos X de todas las moléculas CD1 humanas y de la molécula CD1d murina. El surco de unión antigénica de las moléculas CD1 tiene la misma estructura que el MHC de clase I, con las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ flanqueando una base en lámina- β y un dominio $\alpha 3$ unido por un lado a la hélice $\alpha 2$ y anclado por otro a la membrana plasmática por un segmento transmembrana, unido a una corta cola citoplasmática (Zeng, Castano et al. 1997). El canal de unión de las moléculas CD1 está formado por los bolsillos A' y F' (por analogía con las moléculas MHC de clase I), es de carácter hidrofóbico y es más estrecho y profundo que el de las moléculas MHC de clase I. Estas moléculas son capaces de unir glicolípidos en una orientación que permite a la cabeza polar del

ligando estar expuesta en la superficie de la hélice $\alpha 1$, para ser reconocida por el TCR de las células T (Gadola, Zaccai et al. 2002) (Zajonc, Elsliger et al. 2003).

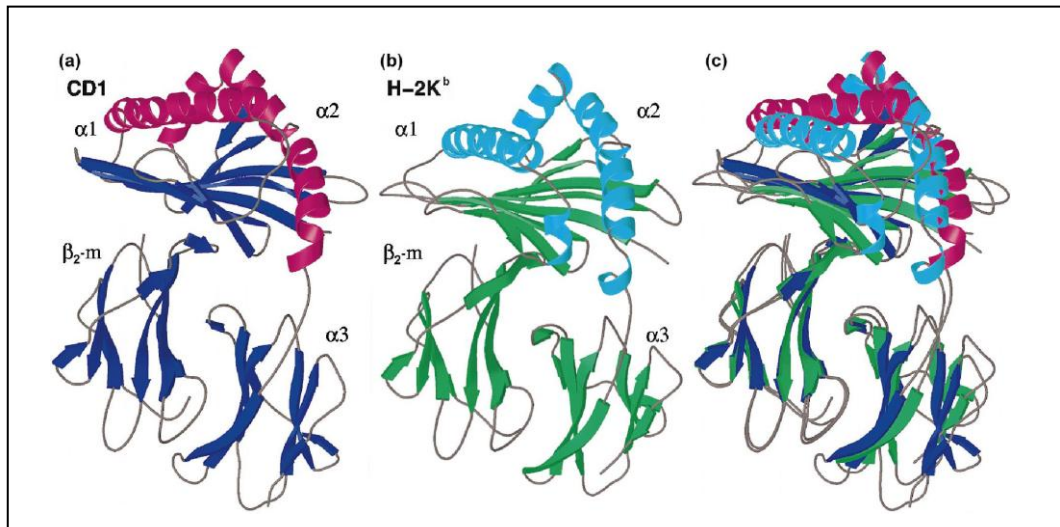


Figura 3. a) Estructura de CD1d1 de ratón (rojo: α -hélices; azul: láminas β ; marrón: giros). b) Estructura del MHC de clase I de ratón (H-2K^b) (cian: α -hélices; verde: láminas β ; marrón: giros). c) Superposición de ambas moléculas. (Adaptado de Porcelly y Modlin, 1999.)

La estructura de los canales hidrofóbicos de las distintas moléculas CD1 condiciona la unión a diferentes ligandos permitiendo la asociación de un repertorio más diverso de antígenos lipídicos.

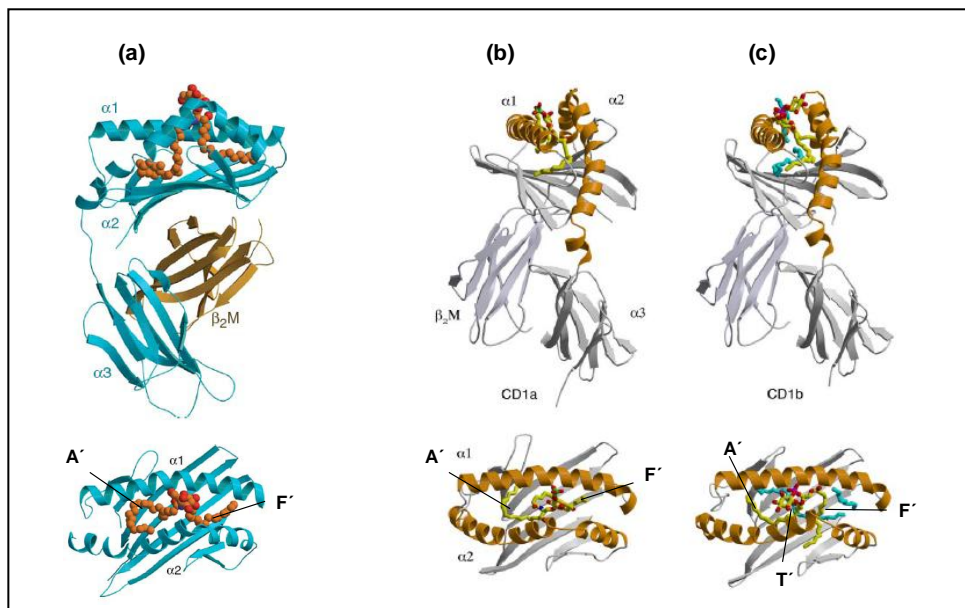


Figura 4. a) Estructura de CD1d humano (azul: α -hélices; marrón: β_2m ; naranja: glicolípido unido a la hendidura de unión). Adaptado de Koch M. et al, 2005. b) Estructura de la molécula CD1a unida a sulfatida. c) Estructura de la molécula CD1b

unida a fosfatidilinositol (marrón: $\alpha 1$ y $\alpha 2$; gris: $\alpha 3$ y $\beta 2m$; amarillo: ligando). (Adaptado de Brigl y Brenner, 2004.)

1.3. Moléculas CD1 del grupo 1: CD1a, -b y -c.

1.3.1. Función: Presentación antigénica a células T.

Hasta la fecha, han sido caracterizados diversos antígenos restringidos por las moléculas CD1 del grupo I.

Antígenos presentados por CD1a. Los principales ligandos que activan la respuesta de células T a través de CD1a son la **sulfatida**, componente lipídico presente en las vainas de mielina neuronales y el **didehidroximicobactin (DDM)** lipopéptido procedente de *Mycobacterium tuberculosis* (Zajonc, Elsliger et al. 2003) (Moody, Young et al. 2004).

Antígenos presentados por CD1b. Los **ácidos micólicos** son una familia de ácidos grasos α y β -hidroxi encontrados inicialmente en la pared celular de *M. tuberculosis* y que estimulan linfocitos T restringidos por CD1b (Beckman, Porcelli et al. 1994) (Beckman, Porcelli et al. 1994). CD1b también es capaz de reconocer **sulfolípidos** (diacilados), **fosfatidilinositol manósidos (PIM)** y **lipoarabinomananos**; todos ellos compuestos procedentes de micobacterias (Moody, Reinhold et al. 1997) (Fischer, Scotet et al. 2004) (Gilleron, Stenger et al. 2004) (Sieling, Chatterjee et al. 1995). CD1b puede unirse además al gangliósido endógeno **GM1** (Shamshiev, Donda et al. 1999) (Shamshiev, Donda et al. 2000).

Antígenos presentados por CD1c. La molécula CD1c es capaz de reconocer lípidos presentes en *M. tuberculosis* y *M. avium*. Hasta el momento se han identificado **hexosil-1-fosfoisoprenoides** y **manosil-1-fosfodolicoles**, formados por una cadena acil saturada con ramificaciones cada cuatro carbonos (Moody, Ulrichs et al. 2000). También puede unir lipopéptidos (Scharf, Li et al. 2010).

Los linfocitos T restringidos por las moléculas CD1a, -b y -c reconocen principalmente antígenos lipídicos derivados de micobacterias y fenotípicamente pueden ser muy diversos ($\alpha\beta$ dobles negativos, $CD4^+$, $CD8^+$ o $\gamma\delta$). Estos linfocitos responden a los antígenos mediante proliferación, producción de citoquinas y citolisis; también poseen actividad microbicida a través de granulisina. (Rosat, Grant et al.

1999) (Stenger, Hanson et al. 1998) (Stenger, Mazzaccaro et al. 1997) (Ochoa, Stenger et al. 2001). Existen además clones autorreactivos, es decir, que reconocen CD1a, -b y -c en ausencia de ligandos exógenos (Brigl and Brenner 2004). Estos linfocitos parece que cooperan en la eliminación temprana de microorganismos, en la inducción de células T de memoria y en la maduración de DCs capaces de producir grandes cantidades de IL-12 (Mendez-Samperio 2010). Algunos estudios han implicado a los linfocitos T autorreactivos restringidos por CD1 en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain-Barré (De Libero and Mori. 2007) (Blewett 2010).

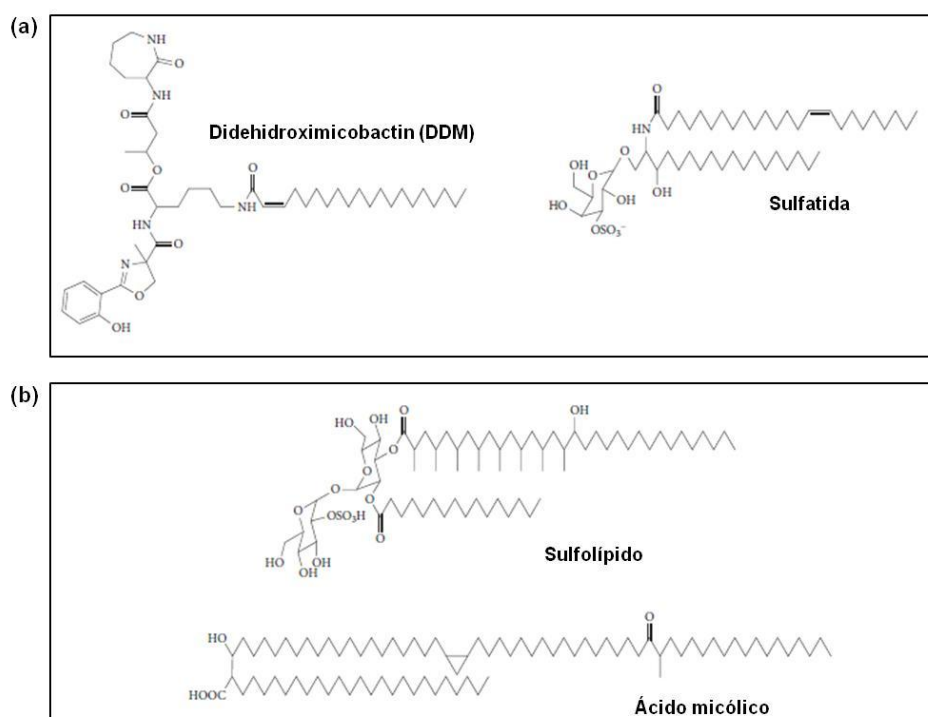


Figura 5. a) Glicolípidos presentados por la molécula CD1a. b) Glicolípidos presentados por la molécula CD1b.

1.3.2. Expresión celular y distribución tisular.

Las moléculas CD1 del grupo I se expresan en timocitos corticales y en células dendríticas (Porcelli, Morita et al. 1992). Las DCs dérmicas e interdigitantes de los ganglios linfáticos expresan CD1b (Cattoretti, Berti et al. 1987). CD1c también aparece en células B de la zona marginal del bazo y en ciertas poblaciones de células B circulantes (Smith, Thomas et al. 1988).

Los monocitos de sangre periférica cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 inducen la expresión de CD1a, -b y -c al ser cultivados en suero de ternera fetal (FCS)

(Porcelli, Morita et al. 1992) (Kasinerk, Baumruker et al. 1993); mientras que al cultivarse en suero humano se inhibe su expresión (Duperrier, Eljaafari et al. 2000) (Pietschmann, Stockl et al. 2000).

Las células progenitoras $CD34^+$ de cordón umbilical o médula ósea pueden generar dos tipos de precursores intermedios en respuesta a GM-CSF y $TNF-\alpha$, que se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de CD1a y CD14: 1) la población $CD1a^+/CD14^-$ da lugar a células dendríticas de tipo Langerhans que expresan Langerina, cadherina-E, gránulos de Birbeck, CD1a y CD1c. Este tipo de DCs parece estar más implicado en inmunidad celular. 2) La población $CD1a^-/CD14^+$ genera DCs más parecidas a las DCs intersticiales que se caracterizan por la presencia de CD1a, -b y -c, pero no presentan Langerina, cadherina-E ni gránulos de Birbeck. Estas células parece que actúan más en inmunidad humoral (Caux, Dezutter-Dambuyant et al. 1992) (Caux, Vanbervliet et al. 1996) (Banchereau, Briere et al. 2000).

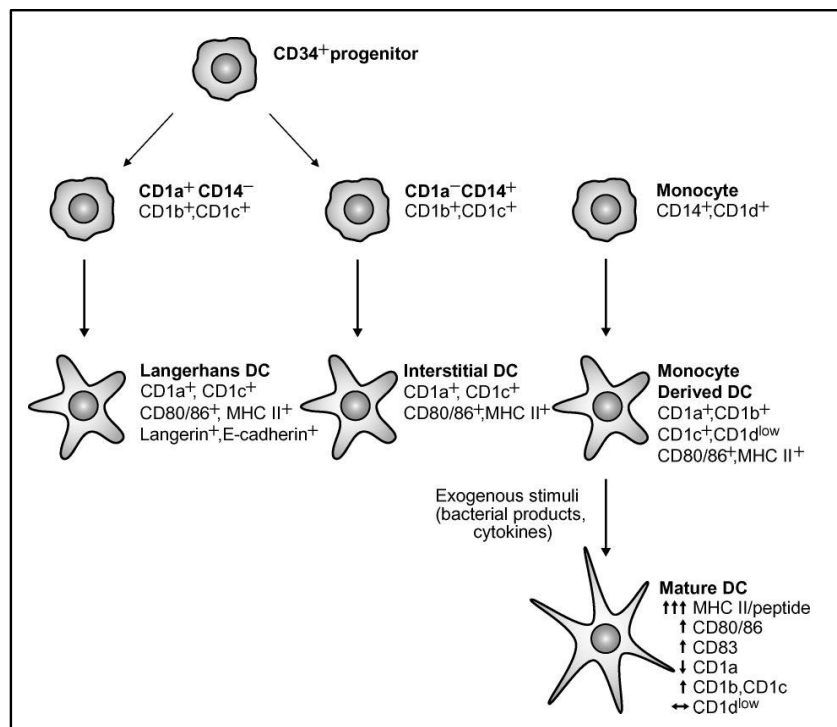


Figura 6. Expresión de las moléculas CD1 durante la ontogenia de las DCs mieloides. (Adaptado de Brigl y Brenner, 2004.)

1.4. CD1 del grupo II: CD1d.

1.4.1. Función: Presentación antigénica a células NKT.

Hasta la fecha se han descrito diversos ligandos de unión a CD1d de distinta naturaleza, con capacidad de activar o inhibir a células T restringidas por CD1d. Estas células se conocen como células T Natural Killer o NKTs. Las células NKT constituyen un linaje muy conservado de linfocitos T con propiedades únicas. Una de sus características más importante es la expresión de receptores típicos de células NK: NK1.1 (CD161 en humanos), NKG2D y Ly49. Existen tres subtipos de células NKT:

- NKTs de **tipo I o invariantes (iNKTs)**, que presentan un TCR canónico V α 24-J α 18 y V β 11 en humanos, y V α 14-J α 18 y V β 8.2, -7 o -2 en ratones (Godfrey, MacDonald et al. 2004). Se encuentran restringidas por la molécula CD1d.
- NKTs de **tipo II o no invariantes**, que poseen un repertorio más amplio en su TCR y que responden igualmente a antígenos lipídicos presentados por CD1d.
- NKTs de **tipo III** presentan un TCR muy diverso, y no se encuentran restringidas por CD1d. Se clasifican atendiendo a la expresión de Ly49 o NK1.1. Esta última categoría ha sido descrita en ratón (Eberl, Lees et al. 1999).

Tabla 1. Características de las células T restringidas por moléculas CD1. (Adaptado de Barral y Brenner, 2007).

	NKTs tipo I o iNKTs	NKTs de tipo II o no invariantes	Células T restringidas por CD1 del grupo I
Antígenos	Lípidos microbianos, endógenos, exógenos	Desconocidos	Lípidos microbianos, endógenos
Población de células T	TCR α canónico pero policlonal	Diversidad clonal	Diversidad clonal
TCR	V α 14 (ratón) o V α 24 (humano) /J α 18; repertorio limitado de V β con un CDR3 diverso	TCR α diverso TCR β diverso	TCR α diverso TCR β diverso
Frecuencia de precursores	<1% de células T (humano); 2-50% en ratones	Desconocida	0,1%, especificidad única para un antígeno
Memoria	No	Desconocida	Sí
Inmunidad	De tipo innata, rápida (de horas a pocos días)	Desconocida	Adaptativa, lenta

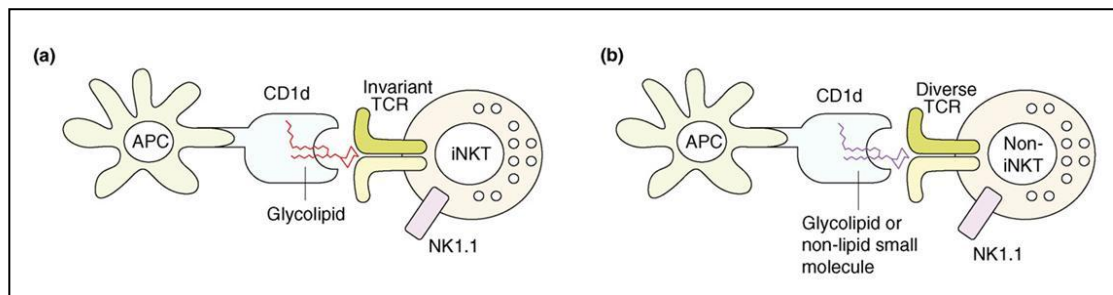


Figura 7. a) Células NKT invariantes o de tipo I. b) Células NKT no invariantes o de tipo II. (Adaptado de Van Kaer, 2007).

Entre los ligandos descritos de CD1d destacan:

Ligandos exógenos y sintéticos. En 1997 Taniguchi et al. demostraron que la **α -Galactosilceramida (α -GalCer)**, glicolípido extraído de la esponja marina *Agelas mauritianus* podía estimular células iNKT haciendo que éstas produjeran rápidamente citoquinas Th1 y Th2 de forma CD1d dependiente (Morita, Motoki et al. 1995) (Kawano, Cui et al. 1997) (Kronenberg 2005). Existen diversos modelos que muestran las propiedades anti-tumorales de la α -GalCer (Brutkiewicz and Sriram 2002). Un análogo de esta molécula es el **OCH**, que posee una cadena esfingosina truncada y tiene mayor capacidad para producir IL-4 que la α -GalCer. El OCH es capaz de disminuir el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) al inducir un patrón Th2 protector (Miyamoto, Miyake et al. 2001). Al modificar la cadena acilo de la α -GalCer y crear una cadena de 20 carbonos di-insaturada (**KRN7000**), aumenta la capacidad de producir IL-4 y disminuye la secreción de IFN- γ (Yu, Im et al. 2005). Por el contrario, la forma **C-glicosilada** de la α -GalCer es capaz de inducir una respuesta Th1 más duradera que la inducida por la α -GalCer (Gonzalez-Aseguinolaza, Van Kaer et al. 2002) (Schmieg, Yang et al. 2005).

Las células NKT no invariantes humanas pueden ser activadas por **fenil pentametildihidrobenczofurano sulfonato (PPBF)**, cuya estructura es similar a las sulfamidas, compuestos capaces de inducir reacciones de hipersensibilidad (Van Rhijn, Young et al. 2004). Por último, **fosfatidilcolina (PC)** y **fosfatidiletanolamina (PE)** procedentes del polen del ciprés son capaces de estimular células T restringidas por CD1d y CD1a (Agea, Russano et al. 2005).

Ligandos endógenos. En 1998 se detectó por primera vez **glucosilfosfatidilinositol (GPI)** unido a CD1d1 murino (Joyce, Woods et al. 1998).

Posteriormente se demostró que la unión era a través del **fosfatidilinositol (PI)**, molécula que se une con gran afinidad a CD1d (De Silva, Park et al. 2002) (Park, Kang et al. 2004). Más recientemente se ha observado **fosfatidilcolina (PC)** (Giabbai, Sidobre et al. 2005) y **fosfatidiletanolamina (PE)**, ésta última molécula es capaz de activar un hibridoma de iNKTs cuya activación depende del grado de insaturación de las cadenas acilo de la PE. También **β -glicoesfingolípidos** endógenos como la β -galactosilceramida y la β -glucosilceramida pueden unirse a CD1d (Godfrey, Pellicci et al. 2010). Estos glucolípidos (GLs) y fosfolípidos (PLs) constituyen ligandos endógenos de CD1d, pero sólo en algunas circunstancias son capaces de estimular células iNKT (Gumperz, Roy et al. 2000). Un ligando endógeno de CD1d en ratón es la **isoglobotrihexosilceramida (iGb3)**, glicoesfingolípido presente en lisosomas, que activa a las células iNKT en la periferia durante infecciones bacterianas (Mattner, Debord et al. 2005). La **sulfatida** puede ser reconocida también por CD1d y activa a células NKT de tipo II o no invariantes (Shamshiev, Gober et al. 2002).

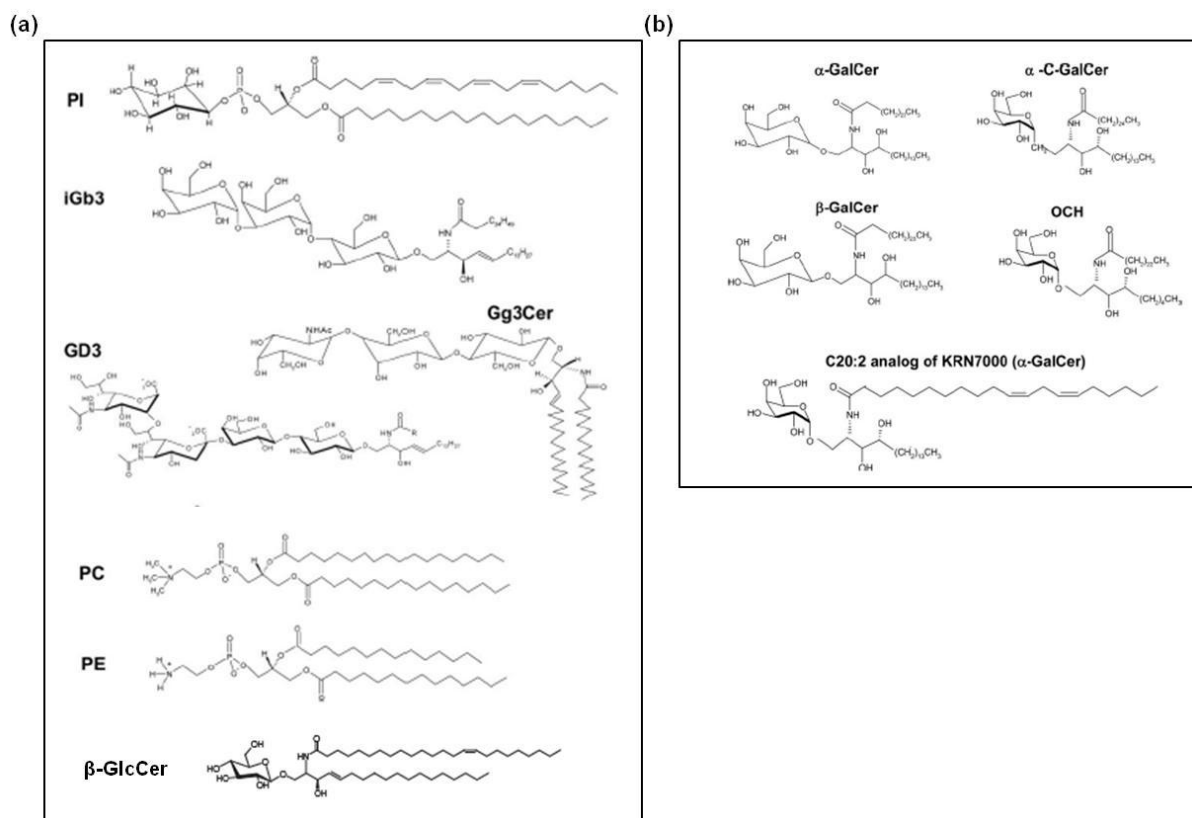


Figura 8. a) Antígenos endógenos presentados por CD1d. b) Antígenos exógenos y sintéticos presentados por CD1d.

El **disialogangliosido GD3** es un componente natural de la membrana celular, que también puede ser presentado por CD1d y estimular células NKT (Wu, Segal et al. 2003). Asimismo, la **gangliotriaosilceramida α GM2** es un lípido derivado de una

línea de linfoma de células T murina que inhibe la presentación antigénica a NKTs mediada por CD1d, mostrando un posible mecanismo de evasión por parte del tumor (Sriram, Cho et al. 2002).

Muy recientemente se ha descrito la existencia de un lípido endógeno muy abundante, la **β -D-glucopiranosilceramida (β -GlcCer)**, que induce la activación de células NKT tanto murinas como humanas. La actividad de este ligando depende de la composición de su cadena N-acil, y se ha observado su acumulación durante infecciones microbianas y en respuesta a agonistas de TLRs (*Toll-like receptors*). (Brennan, Tatituri et al. 2011).

Ligandos microbianos. **Glucoesfingolípidos**, como la α -glucuronosilceramida (GSL-1) y la α -galacturonosilceramida, presentes en bacterias *Esingomonas* y **α -galactosildiacilglicerol** procedente de *Borrelia burgdorferi* (agente causante de la enfermedad de Lyme) son compuestos capaces de activar células iNKT de forma CD1d dependiente (Kinjo, Wu et al. 2005) (Mattner, Debord et al. 2005) (Sriram, Du et al. 2005) (Wu, Xing et al. 2005) (Tupin, Kinjo et al. 2007). CD1d, al igual que la molécula CD1b es capaz de unir **PI manósidos** procedentes de micobacterias y estimular NKTs tanto humanas como murinas (Fischer, Scotet et al. 2004).

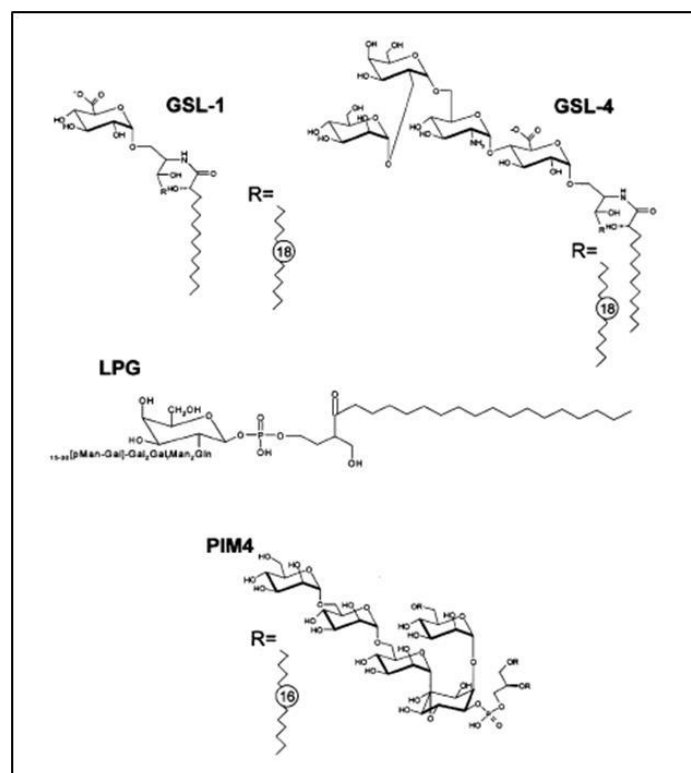


Figura 9. Antígenos microbianos presentados por CD1d.

También se ha descrito recientemente la activación de NKTs por **colesterol α -glucósido** procedente de *Helicobacter pylori* (Chang, Kim et al. 2011). Asimismo, **lipofosfoglicano (LPG)** y **fosfolípidos de glucoinositol** procedentes de la superficie de *Leishmania* pueden unirse a CD1d y estimular la producción de IFN- γ de forma CD1d dependiente (Amprey, Im et al. 2004).

1.4.2. Expresión celular y distribución tisular.

Las moléculas CD1d se expresan de forma generalizada en células mieloides (DCs, monocitos y macrófagos) (Brossay, Jullien et al. 1997) (Roark, Park et al. 1998). En monocitos *in vitro* se pueden detectar bajos niveles de expresión de CD1d que además disminuyen al cultivarse en presencia de GM-CSF e IL-4, condición en la que se estimula la expresión de las moléculas CD1 del grupo I (Spada, Borriello et al. 2000). La maduración de las DCs derivadas de monocitos con LPS, TNF- α o CD40/CD40L no altera la expresión de CD1d de forma significativa (Exley, Garcia et al. 2000). CD1d también se ha detectado *in situ* por inmunohistoquímica en DCs dérmicas, pero no en DCs de Langerhans (Gerlini, Hefti et al. 2001).

Asimismo CD1d se expresa en células B circulantes y de bazo (Exley, Garcia et al. 2000) (Blumberg, Terhorst et al. 1991). En los ganglios linfáticos las células B del manto expresan altos niveles de CD1d, mientras que en los centros germinales las células B CD1d⁺ son más escasas. Existe alta expresión de CD1d en timocitos corticales. Además, también se expresa en células epiteliales y parenquimales de intestino e hígado. (Blumberg, Terhorst et al. 1991) (Canchis, Bhan et al. 1993).

1.5. Tráfico intracelular de las moléculas CD1.

Tráfico intracelular. En el RER las moléculas CD1 se unen a lípidos endógenos que pueden actuar como chaperonas, estabilizando el complejo y evitando que se colapse. La carga de lípidos en el RER requiere de la actividad de proteínas capaces de transferir lípidos del retículo a las moléculas CD1. La **proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTTP)** se asocia con CD1d, siendo capaz de transferir lípidos como la PE (Brozovic, Nagaishi et al. 2004) (Dougan, Salas et al. 2005).

Después de su síntesis y ensamblaje en el RER, las moléculas CD1 migran a través del Golgi y, a excepción de CD1e, alcanzan la superficie celular. Desde allí pueden ser re-internalizadas hacia la vía endocítica, de forma que el tráfico de estas moléculas varía dependiendo de la isoforma de CD1 y de la composición aminoacídica

de sus colas citoplasmáticas (Sugita, Cernadas et al. 2004). Por ejemplo, CD1a tiene una cola citoplasmática corta que le permite ser internalizada en endosomas tempranos y transitar hacia endosomas de reciclaje donde puede quedar retenida de forma transitoria. Así pues, CD1a se recicla entre estos compartimentos endosómicos y la superficie celular, donde se estabiliza al unirse a glicolípidos exógenos (Sugita, Grant et al. 1999) (Manolova, Kistowska et al. 2006).

Por el contrario las colas citoplasmáticas de CD1b, CD1c y CD1d tanto murino como humano, contienen motivos tirosina YXXZ (Y=tirosina, X=cualquier aminoácido, Z=aminoácido hidrofóbico) que se asocian con la proteína adaptadora **AP-2** y se internalizan hacia diversos compartimentos endosomales a través de vesículas recubiertas de clatrina (Briken, Jackman et al. 2000) (Briken, Jackman et al. 2002) (Lawton, Prigozy et al. 2005). Los motivos YXXZ de CD1b y CD1d de ratón interaccionan también con la proteína adaptadora **AP-3** que dirige a estas moléculas más internamente hacia lisosomas y cuerpos multivesiculares conocidos como **compartimentos de MHC de clase II (MIIC)** (Cernadas, Sugita et al. 2003) (Elewaut, Lawton et al. 2003) (Sugita, Jackman et al. 1996). Una ruta alternativa que permite a CD1d humano y murino alcanzar el MIIC es mediante su asociación a la **cadena invariante (Ii)** o al **complejo Ii/MHC-II** (Brozovic, Nagaishi et al. 2004) (Jayawardena-Wolf, Benlagha et al. 2001) (Kang and Cresswell 2002).

La **proteína activadora GM2 (GM2A)** y las **saposinas A-D**, se encuentran en endosomas tardíos y en lisosomas, donde pueden cargar lípidos endógenos y exógenos en moléculas CD1b y CD1d. La proteína GM2A estimula el procesamiento enzimático de gangliósidos. Las saposinas son capaces de intercambiar lípidos unidos a CD1d y son necesarias para la correcta generación de los complejos α -GalCer/CD1d en APCs humanas (Kang and Cresswell 2004) (Winau, Schwierzeck et al. 2004) (Zhou, Cantu et al. 2004).

En resumen, las diferencias en el tráfico intracelular de cada molécula CD1 determina su localización intracelular: CD1a se encuentra principalmente en la superficie celular y en endosomas tempranos, mientras que CD1c y CD1d humano se acumulan sobre todo en endosomas tempranos y tardíos. CD1b humano y CD1d murino se encuentran principalmente en lisosomas y compartimentos MIIC.

Captura antigénica. Existen distintos mecanismos de captura de lípidos exógenos al interior celular: **endocitosis**, **fagocitosis**, lípidos asociados a la

apolipoproteína E (Apo-E), receptores de manosa y langerina. En macrófagos (Mφ), por ejemplo, los receptores de manosa pueden capturar glicolípidos y liberarlos a compartimentos endocíticos facilitando su presentación por CD1 (Prigozy, Sieling et al. 1997). La langerina (CD207), presente en las células de Langerhans, puede capturar antígenos de *Mycobacterium leprae* y facilitar su presentación por CD1a (Hunger, Sieling et al. 2004). Por último, las propias moléculas CD1 (**CD1a y CD1d**) parece que pueden estar implicadas en la captura antigénica, observándose que al bloquear estas moléculas se inhibe la adhesión de DCs a granos de polen de ciprés (Agea, Russano et al. 2005).

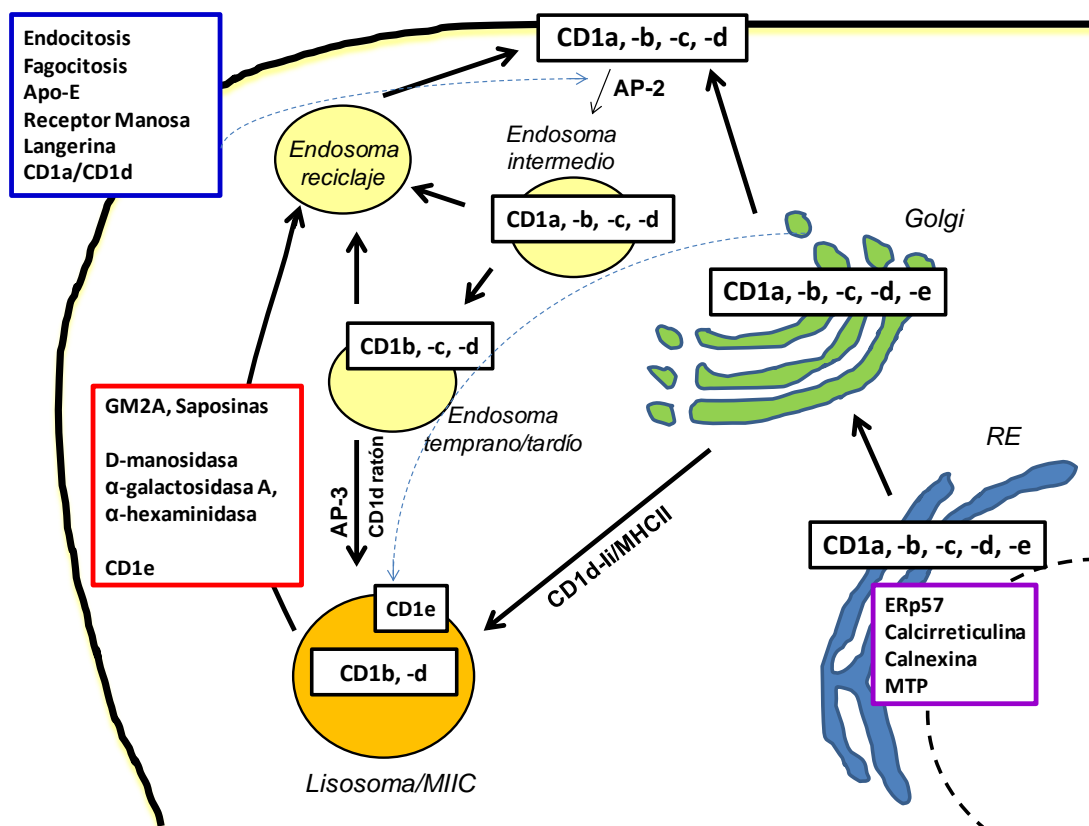


Figura 10. Tráfico intracelular de las moléculas CD1. Las flechas indican el destino principal de cada una de las moléculas CD1. En los recuadros se indican los factores y moléculas implicados en la internalización, carga y procesamiento de antígenos. (Adaptado de Bricard y Porcelli, 2007).

Procesamiento antigénico. Las glicosidasas endosomales y lisosomales parecen estar implicadas en el procesamiento de antígenos glicolipídicos. La acción enzimática de **manosidasas** sobre glicolípidos manosilados es esencial para su presentación por moléculas CD1. La enzima lisosomal **α-galactosidasa A** degrada α-digalactosilceramida generando la forma α-GalCer que es presentada de forma

eficiente a células restringidas por CD1d (Prigozy, Naidenko et al. 2001). Asimismo la enzima lisosomal **hexosaminidasa** es necesaria para la degradación de iGb4 en iGb3, que es la forma endógena que puede ser reconocida por células T restringidas por CD1d (Zhou, Mattner et al. 2004).

1.6. Mecanismos de regulación de la expresión de CD1d.

La expresión de la molécula CD1d se encuentra regulada por distintas vías:

El factor de transcripción **PPAR- γ** controla la expresión de CD1d mediante la activación de la síntesis de ácido retinoico en DCs humanas (Szatmari, Pap et al. 2006). Así, la activación de PPAR- γ aumenta la síntesis de la enzima retinol deshidrogenasa 10 (RDH10) que convierte el retinol (derivado de la vitamina A) en retinal, y de la enzima que transforma el retinal en ácido retinoico all-trans (**ATRA**), esto es, la retinaldehído deshidrogenasa 2 (RALDH2). El ATRA es un ligando para los receptores de ácido retinoico (RARs), que al ser activados inducen un aumento en la expresión de CD1d al mismo tiempo que disminuyen la síntesis de CD1a. Por tanto, ligandos de PPAR- γ tanto sintéticos (Rosiglitazona) (Lehmann, Moore et al. 1995) como naturales (ácidos grasos (Kliwer, Sundseth et al. 1997), LDL oxidadas (Nagy, Tontono et al. 1998), prostaglandinas (Kliwer, Lenhard et al. 1995) (Forman, Tontono et al. 1995)) son capaces de inducir la expresión de CD1d a través de ATRA.

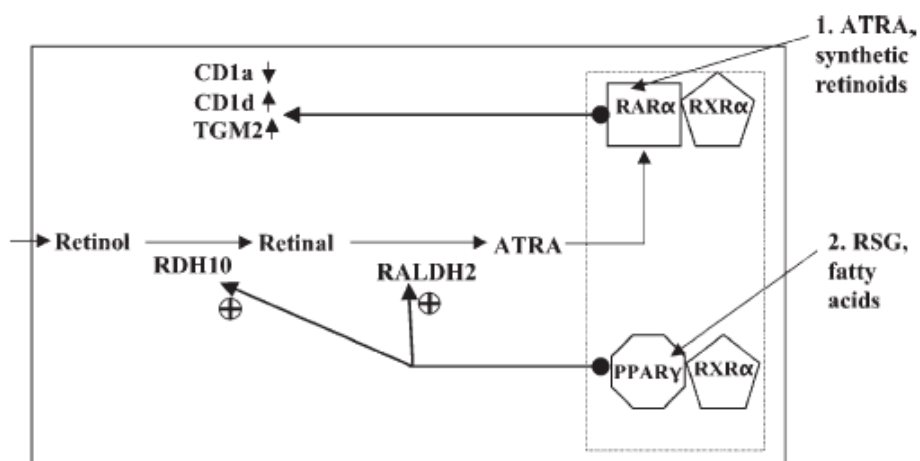


Figura 11. Regulación de la expresión de CD1d a través de la síntesis de ácido retinoico en DCs. (Adaptado de Szatmari et al., 2006)

Recientemente se ha descrito que los fosfolípidos presentes en el suero humano, cardiolipina y ácido fosfatídico, activan PPAR- γ induciendo la expresión de CD1d en las DCs (Leslie, Dascher et al. 2008).

Existen diversas citoquinas capaces de influir en la expresión de CD1d. Por ejemplo, la citoquina proinflamatoria **IFN- β** incrementa la síntesis *de novo* de CD1d por un mecanismo postranscripcional. Al infectar DCs y macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* con la bacteria intracelular *Listeria monocytogenes* se produce un aumento en la expresión de CD1d mediada por la producción de IFN- β . Este aumento de CD1d genera una activación mayor de las células NKT (Raghuraman, Geng et al. 2006). El **IFN- γ** junto con una segunda señal proporcionada por bacterias, productos microbianos o por la citoquina proinflamatoria TNF, induce aumento en la expresión de CD1d en macrófagos (Skold, Xiong et al. 2005). El IFN- γ también aumenta la expresión en superficie de CD1d en líneas celulares de epitelio intestinal (Colgan, Morales et al. 1996). A diferencia del IFN- β y el IFN- γ , **TGF- β** disminuye la expresión de CD1d a nivel transcripcional en células de Langerhans generadas *in vitro*. El TGF- β secretado por queratinocitos humanos tiene efectos inhibidores en la proliferación y diferenciación de células inmunes, entre ellas células NKT. Por ello, se ha sugerido que el TGF- β secretado por los queratinocitos puede ser responsable de que CD1d no se encuentre en células de Langerhans aisladas de la epidermis (Ronger-Savle, Valladeau et al. 2005). Además, la expresión de CD1d disminuye en DCs infiltradas en melanomas metastásicos debido a la secreción de **IL-10** por parte del melanoma (Gerlini, Tun-Kyi et al. 2004).

Los niveles de **IgG** son capaces de regular el patrón de expresión de CD1d en DCs a nivel génico a través del receptor de Fc γ (Fc γ RIIa). DCs derivadas de monocitos cultivadas en medios ricos en Igs expresan CD1d pero no CD1a, -b o -c, mientras que en medios pobres en Igs se produce el patrón contrario (Smed-Sorensen, Moll et al. 2008).

En los últimos años se han descrito varios trabajos que muestran mecanismos de *down*-regulación de CD1d a través del proceso de **ubiquitinización**. Por ejemplo, proteínas moduladoras del reconocimiento inmune (MIR) del *Herpes* virus asociado al sarcoma de Kaposi disminuyen la expresión de CD1d por ubiquitinización del residuo de lisina de la cola citoplasmática de CD1d, aumentando la endocitosis de la molécula. (Sanchez, Gumperz et al. 2005). El virus *Herpes simplex* de tipo 1 (HSV-1) evita la reaparición de las moléculas CD1d endocitadas desde la superficie celular por

redistribución del CD1d endocitado por toda la membrana lisosomal (Yuan, Dasgupta et al. 2006). La infección por *Chlamidia trachomatis* disminuye la expresión en superficie de CD1d en células epiteliales uretrales humanas a través de ubiquitinización y posterior degradación por el proteasoma y por proteasas citosólicas (Kawana, Quayle et al. 2007). CD1d se expresa menos en tejidos infectados por el virus del Papiloma humano debido a la interacción de la proteína E5 del virus con la calnexina, lo que produce un mal plegamiento y/o ubiquitinización de la molécula CD1d y aumenta su degradación por el proteasoma (Miura, Kawana et al. 2010). Por otro lado, el virus del VIH incrementa la internalización de CD1d a través de las proteínas *Nef* del virus, que retienen CD1d en el trans-Golgi (Chen, McCarthy et al. 2006).

2. Células dendríticas y macrófagos.

Las DCs son las más potentes activadoras de linfocitos T. Cuando son inmaduras se localizan en órganos de la periferia y superficies mucosas y son muy eficientes en la captura de antígenos y en la liberación de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Sallusto, Mackay et al. 2000). Las DCs pueden generar una respuesta Th1 o Th2 dependiendo del ambiente que las rodee o de los estímulos que reciban (Kalinski, Schuitemaker et al. 1999) (Vieira, de Jong et al. 2000) (Tanaka, Demeure et al. 2000) (Nagai, Devergne et al. 2003).

Estas células poseen receptores tipo TLR capaces de reconocer determinados componentes de los patógenos. El TLR4 reconoce lipopolisacárido (LPS) presente en la pared bacteriana. La estimulación a través de los TLRs produce la maduración de las células dendríticas y su migración a nódulos linfáticos (Iwasaki and Medzhitov 2004) (Shi, Harrison et al. 2004) (Hou and Van Parijs 2004) (Akira 2003) (Gordon 2002) (Park, Hondowicz et al. 2002) (Reis e Sousa 2004), convirtiéndose en DCs maduras (mDC) con mayor capacidad para presentar antígenos (aumento en la expresión de MHC y de moléculas co-estimuladoras: CD40, CD80 y CD86) y activar a linfocitos T (Steinman 2003).

Las DCs más caracterizadas en humanos son las células dendríticas epidérmicas (Langerhans), células dendríticas dérmicas (intersticiales), células interdigitantes en nódulos linfáticos y las células dendríticas de sangre periférica

mieloides o plasmacitoides. En los últimos años se ha estado trabajando con un modelo de diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos tratados con IL-4 y GM-CSF (Chapuis, Rosenzweig et al. 1997), obteniéndose un fenotipo de DCs inmaduras.

Por otra parte, los macrófagos ($M\phi$) se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos periféricos, donde juegan un papel indispensable en la defensa contra patógenos y en el mantenimiento de la homeostasis. Los $M\phi$ se polarizan dependiendo de los factores presentes en el microambiente, en dos grupos principales:

- **$M\phi$ activados por la vía clásica (CAM ϕ o M1)**, cuyos estímulos de activación son el IFN- γ y el LPS. Poseen una potente actividad antimicrobiana y promueven respuestas Th1.
- **$M\phi$ activados por la vía alternativa (AAM ϕ o M2)** inducidos tras la exposición a IL-4 o IL-13. Realizan funciones asociadas a las respuestas Th2 y son importantes también en la reparación de tejidos, de forma que estas células producen componentes implicados en la síntesis de la matriz extracelular (ECM) (Mosser 2003) (Gordon 2003) (Lolmede, Campana et al. 2009).

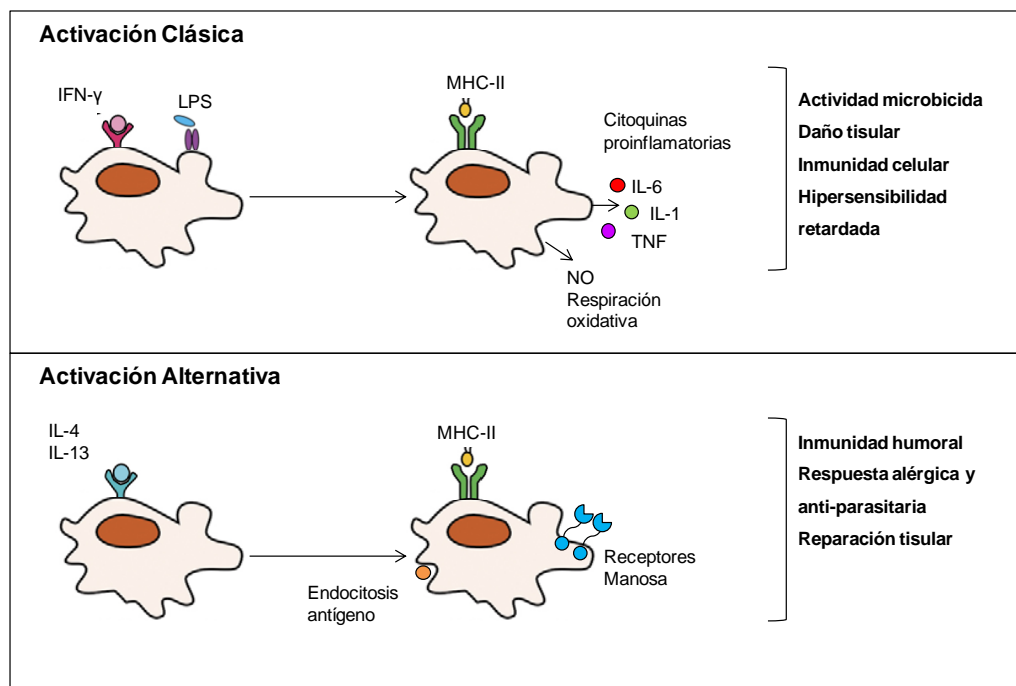


Figura 12. Principales vías de activación de los macrófagos. (Adaptado de Gordon et al., 2003).

3. Células NKT tipo I o invariantes.

3.1. Características generales.

Como se ha mencionado anteriormente, las células iNKT restringidas por CD1d presentan un TCR canónico: V α 24-J α 18/V β 11 en humanos y V α 14-J α 18/V β 8.2, -7 ó -2 en ratones.

En ratones, las células iNKT se encuentran con mayor frecuencia en el hígado (15-35% de los linfocitos) y constituyen entre un 0,2-0,5% de los linfocitos en médula ósea, timo, bazo y sangre periférica. En humano la cantidad de iNKTs es menor y existe mucha variabilidad entre individuos (0,01-0,1% en sangre periférica, médula ósea y bazo) (Lee, Putnam et al. 2002). La mayoría de iNKTs exhiben un **fenotipo activado** o de **memoria**, expresando CD69⁺, CD62L^{low}, CD44^{high} y CD122^{high}. Al contrario que las células T convencionales, las iNKTs no necesitan haber estado en contacto con antígenos previamente para activarse, sino que poseen una auto-reactividad controlada que puede contribuir a mantener la tolerancia inmune (Bendelac, Bonneville et al. 2001) (Yu and Porcelli 2005) (Jiang, Kojo et al. 2007).

En ratones las células iNKT son exclusivamente CD4⁺ o dobles negativas (DN); en cambio en humanos pueden ser también CD8⁺ (Ishihara, Nieda et al. 1999). Además, las células iNKT CD4⁺ (en humano) poseen un patrón de secreción de citoquinas tanto Th1 como Th2, mientras que las células DN presentan un patrón de secreción Th1 (Godfrey and Kronenberg 2004) (Seino and Taniguchi 2005).

Las células iNKT se desarrollan en el timo (Ishihara, Nieda et al. 1999) y son seleccionadas en el estadio doble positivo (DP) por **timocitos doble positivos** que expresan CD1d. Una vez que se han seleccionado y expandido en el timo sufren un proceso de maduración en la periferia, donde adquieren la expresión de receptores NK. Sin embargo, existe un subgrupo de iNKTs que no adquiere la expresión de estos receptores, constituyendo un subtipo funcionalmente distinto a las células iNKT NK1.1⁺ (McNab, Pellicci et al. 2007). El proceso de maduración depende de la correcta expresión de receptores para citoquinas, moléculas de transducción de señales (Fyn, SAP), factores de transcripción (Godfrey and Berzins 2007) y moléculas coestimuladoras como CD28 e ICOS (Chung, Nurieva et al. 2008).

3.2. Funciones.

Las células iNKT son capaces de llevar a cabo diferentes funciones durante la respuesta inmune y han sido implicadas en procesos infecciosos, tumores, rechazo a trasplantes y en enfermedades de tipo inflamatorio y autoinmune (Brigl and Brenner 2004) (Taniguchi, Harada et al. 2003) (Kronenberg 2005) (Van Kaer 2004). Las células iNKT no sólo tienen la capacidad de producir citoquinas y quimiocinas rápidamente, sino que también pueden influir en el comportamiento de muchas otras células del sistema inmune (Matsuda, Mallevaey et al. 2008).

Secreción de citoquinas y quimiocinas. Hasta la fecha se ha descrito que las iNKTs son capaces de secretar **IFN γ , IL-4, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF- α , TNF β y GM-CSF** (Bendelac, Savage et al. 2007) (Michel, Keller et al. 2007) (Pichavant, Goya et al. 2008) (Coquet, Kyparissoudis et al. 2007) (Sakuishi, Oki et al. 2007) (Gumperz, Miyake et al. 2002). También pueden producir un amplio repertorio de quimiocinas: **RANTES, eotaxina, LT, proteínas inflamatorias de M ϕ : MIP-1 α y MIP-1 β** (Matsuda, Mallevaey et al. 2008).

Inicialmente se observó que al administrar α -GalCer *in vivo*, las células iNKT secretaban en pocas horas una gran cantidad de IFN γ y de IL-4. Las iNKTs en reposo poseen altos niveles de RNAm para IL4 e IFN γ y co-expresan los factores de transcripción T-bet y GATA-3, que regulan la ratio Th1/Th2, induciendo la transcripción de IFN- γ y de IL-4, respectivamente (Stetson, Mohrs et al. 2003).

Actividad citolítica. Las células iNKT expresan altos niveles de **granzima B, perforina y FasL** que determinan su capacidad citolítica CD1d-dependiente. Distintos modelos murinos revelan un papel importante de las iNKTs en la vigilancia y rechazo tumoral, así como en la respuesta inmune frente a bacterias. Sin embargo, la contribución de las células iNKT en estos modelos puede ser debida en su mayor parte a la activación de las células NK a través de la secreción de IFN- γ (Crowe, Smyth et al. 2002) (Mattner, Debord et al. 2005) (Kinjo, Wu et al. 2005) (Ranson, Brehnholt et al. 2005).

Regulación de otras células inmunes. Las citoquinas secretadas por las células iNKT les otorgan la capacidad de influir en multitud de tipos celulares, incluidas las células NK, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ convencionales, macrófagos, células B o DCs. También pueden regular el reclutamiento de neutrófilos a través del IFN- γ (Kronenberg and Gapin 2002) (Matsuda, Zhang et al. 2006). Las células iNKT activadas pueden

modular la función de células T reguladoras (T reg) $CD4^+ CD25^+$ a través de un mecanismo dependiente de IL-2; mientras que las T reg pueden suprimir la acción de las células iNKT por mecanismos dependientes de contacto (La Cava, Van Kaer et al. 2006) (Godfrey, MacDonald et al. 2004).

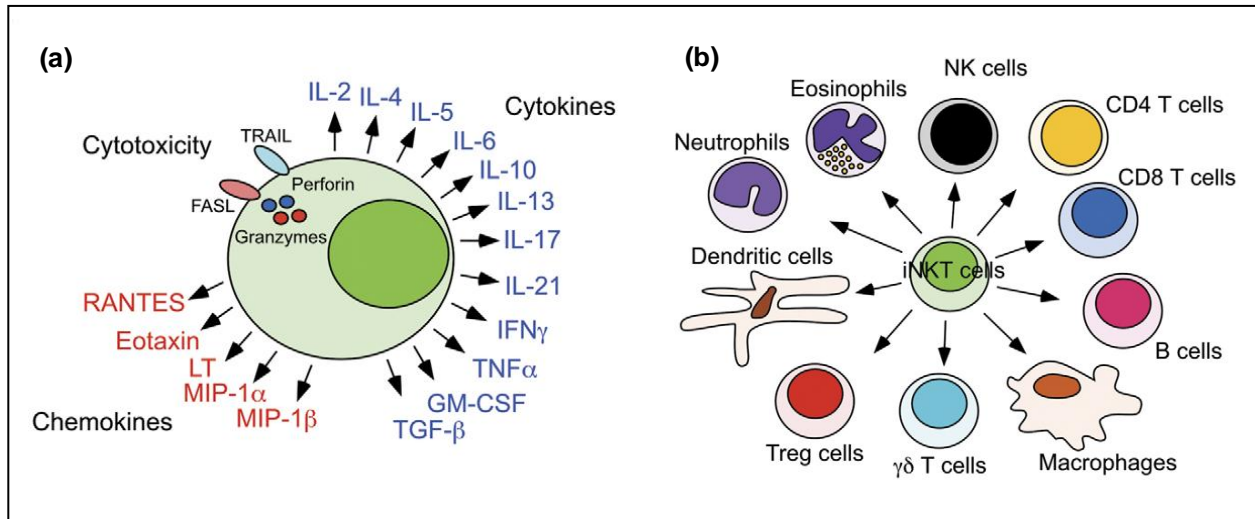


Figura 13. a) Producción de citoquinas y quimiocinas por las células iNKT e inducción de actividad citotóxica. b) Influencia de las células iNKT sobre distintas células del sistema inmune innato y adaptativo. (Adaptado de Matsuda et al., 2008).

3.3. Mecanismos de activación.

Existen diversas vías de activación de células iNKT:

Activación directa por antígenos exógenos. Las iNKTs pueden reconocer α -glicoesfingolípidos y diacilgliceroles procedentes de las bacterias gram negativas *Esferingomonas*, *Ehrlichia* y *Borrelia burgdorferi*, de forma CD1d dependiente, (Mattner, Debord et al. 2005) (Kinjo, Wu et al. 2005) (Kinjo, Tupin et al. 2006) (Sriram, Du et al. 2005). Estos antígenos bacterianos inducen la producción de IFN- γ e IL-4 por parte de las iNKTs. Se ha propuesto que estos glicolípidos podrían actuar como sustitutos del LPS u otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) para activar la respuesta inmune a través de las células iNKT, apoyando la idea de que las iNKT sirven como puente de unión entre el sistema innato y adaptativo (Matsuda, Mallevaey et al. 2008).

Activación indirecta CD1d/TCR dependiente. Se ha demostrado que al cultivar bacterias Gram positivas (ej. *Staphylococcus aureus*) o Gram negativas (ej. *Salmonella typhimurium*) en presencia de DCs éstas pueden activar células iNKT. Este mecanismo es dependiente de la activación de TLRs y del reconocimiento de glicolípidos endógenos a través de CD1d. La activación de las APCs a través de TLRs parece que podría modular la vía biosintética de lípidos, induciendo *up*-regulación de CD1d (Brigl, Bry et al. 2003) (Salio, Speak et al. 2007). En la activación de iNKTs a través de TLR7 y TLR9 se requiere además de co-estimulación por interferón de tipo I (Paget, Mallevaey et al. 2007).

La β -D-glucopiranosilceramida (citada anteriormente) es un antígeno endógeno presentado por CD1d que se acumula en respuesta a agonistas de TLRs, aumentando la activación de las células iNKT (Brennan, Tatituri et al. 2011).

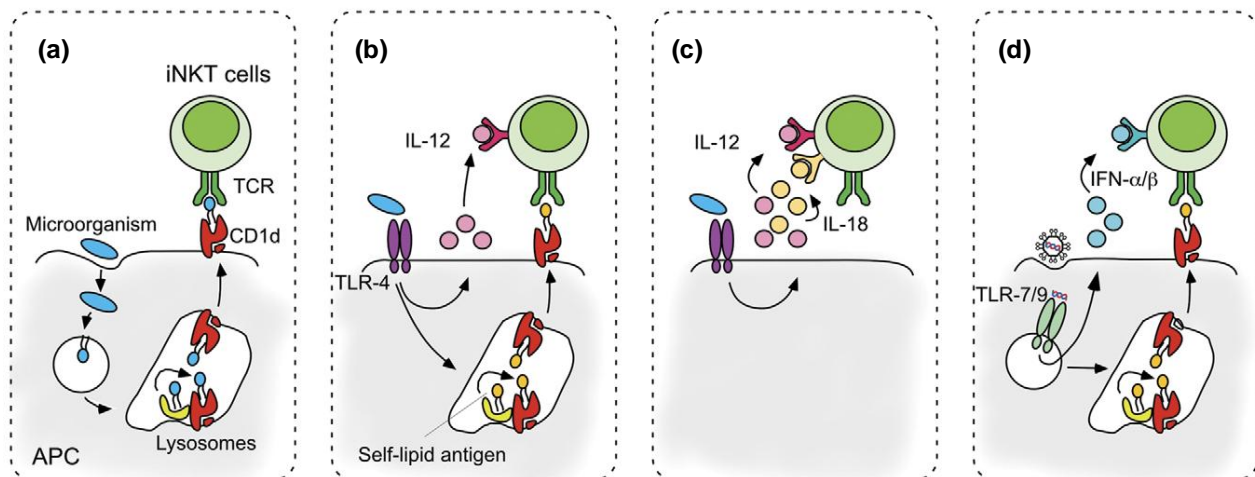


Figura 14. Vías de activación de las células iNKT. (a) Activación directa por antígenos exógenos. (b) Activación indirecta por antígenos endógenos más co-estimulación por IL-12. (c) Mecanismo independiente de CD1d, dependiente de IL12/IL-18. (d) Activación indirecta por antígenos endógenos más co-estimulación por TLR7/9. (Adaptado de Matsuda et al., 2008).

Activación indirecta CD1d independiente. LPS procedente de *E. coli* puede activar a las células iNKT tras su exposición a IL-12 e IL-18 procedente de APCs, de forma independiente a CD1d (Nagarajan and Kronenberg 2007).

Por otro lado es importante tener en cuenta el mecanismo por el cual las células iNKT son capaces de impedir su sobreestimulación. La enzima lisosomal α -**Galactosidasa** controla la producción de antígenos lipídicos endógenos en las DCs, de forma que en ausencia de esta enzima se produce acumulación de lípidos propios,

produciendo activación de las células iNKT. Productos de origen bacteriano también pueden inducir inhibición de la actividad de la α -Galactosidasa. Este bloqueo transitorio es dependiente de la señalización por TLR y lleva a la acumulación de lípidos en los lisosomas induciendo la activación de las células iNKT.

3.4. Células iNKT en patología.

Las células iNKT participan en la respuesta inmune frente a distintos agentes infecciosos y están involucradas en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes, inflamatorias, procesos alérgicos y en cáncer. La implicación de las células iNKT en patología puede dividirse en 2 categorías: 1) frecuencia o función disminuida de las iNKTs, afectando a la regulación de la respuesta inmune e incrementando la predisposición a padecer ciertas enfermedades autoinmunes, cáncer o infecciones; 2) activación excesiva o inapropiada de las células iNKT, lo que contribuye a exacerbar enfermedades como la aterosclerosis, asma, alergia o psoriasis (Berzins, Smyth et al. 2011).

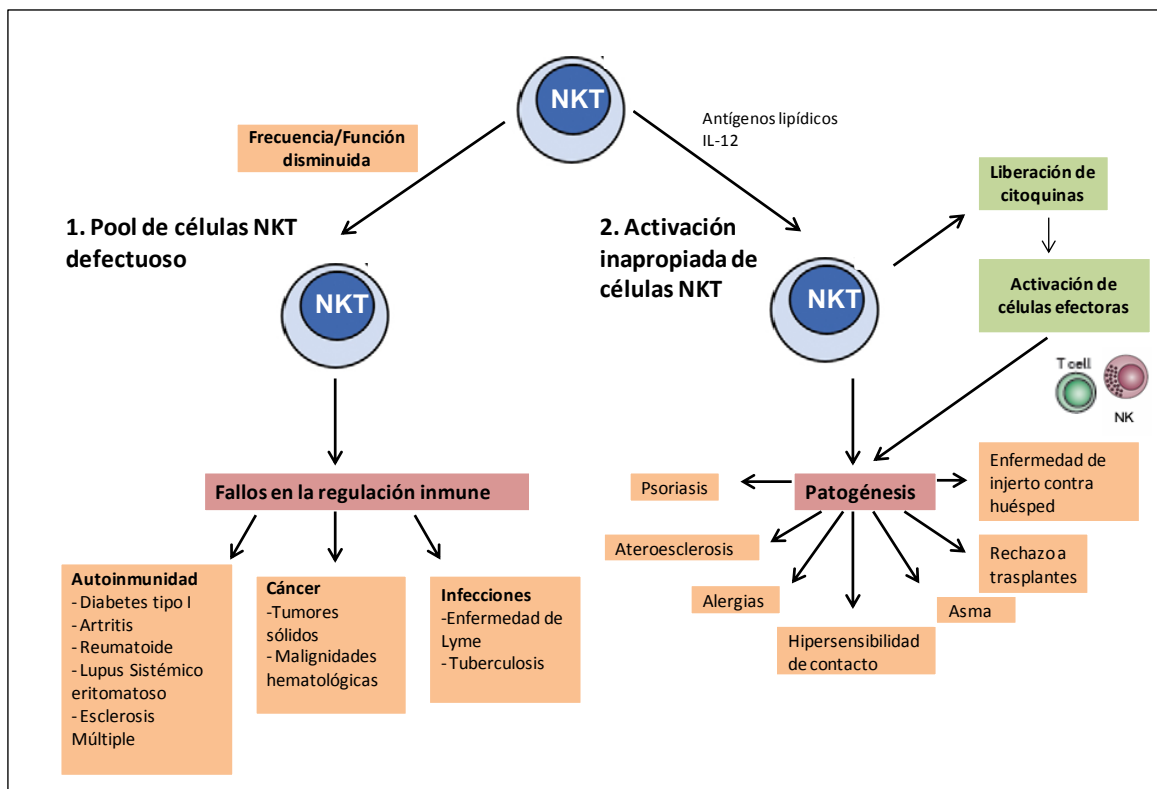


Figura 15. Relación de las células NKT con distintas patologías. Destacan dos mecanismos principales: 1) defectos cuantitativos o cualitativos en las células NKT que afectan a su función inmunorreguladora, induciendo enfermedades de tipo autoinmune, cáncer o procesos

infecciosos; 2) activación inapropiada de las células NKT hacia ligandos endógenos o exógenos, o citoquinas, que contribuye a la patogénesis de enfermedades como el asma, la aterosclerosis o en las reacciones de injerto contra huésped. (Adaptado de Berzins et al., 2011).

Células iNKT e infecciones. Ante determinados microorganismos las iNKTs son capaces de controlar el crecimiento microbiano, influir en la producción de anticuerpos y/o contribuir en el daño tisular inmunopatológico producido.

Ratones deficientes en CD1d mostraron una peor respuesta en la eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* de los pulmones, observándose una disminución en la activación de macrófagos y en el reclutamiento de neutrófilos (Nieuwenhuis, Matsumoto et al. 2002). En infecciones por *micobacterias* en humanos, se ha encontrado alta expresión de CD1d en granulomas tuberculosos (Gansert, Kiessler et al. 2003) y transcritos Vα24Jα18 en lesiones lepromatosas (Mempel, Flageul et al. 2000).

Las células iNKT parecen tener también un papel protector frente a algunas infecciones víricas. Por ejemplo, los ratones deficientes en CD1d son más susceptibles a la infección por *Herpes simplex* tipo 1 y 2 (Grubor-Bauk, Simmons et al. 2003) (Ashkar and Rosenthal 2003) y desarrollan infecciones más severas al ser tratados con el virus respiratorio sincitial (RSV) (Johnson, Hong et al. 2002). Por otro lado, las células iNKT parecen modular la respuesta Th2 ante infecciones por parásitos y hongos.

Células iNKT y autoinmunidad. La estimulación o transferencia de células iNKT parece ser beneficiosa en modelos murinos de diabetes, EAE y en artritis inducida por colágeno. En la EAE y diabetes tipo I el efecto beneficioso podía atribuirse a la inducción de IL-4 por las células T autorreactivas (Godfrey and Kronenberg 2004). Sin embargo, este hecho no se ha observado siempre e incluso existe un caso de agravamiento de la EAE al estimular NKTs con α-GalCer (Jahng, Maricic et al. 2001). Por otro lado, el modelo murino de lupus eritomatoso sistémico (NZB X NZW) F1, muestra la contribución de las células iNKT a la patogénesis de la enfermedad mediante la inducción de anticuerpos anti-DNA (Zeng, Liu et al. 2003). En la colitis inducida por oxazolona las iNKTs son necesarias para la inducción de la enfermedad, incluso en ausencia de α-GalCer. Parece que la secreción de IL-13 por las iNKTs es muy importante para el desarrollo de la colitis (Heller, Fuss et al. 2002).

Células iNKT y tumores. Existen múltiples estudios en modelos de ratón que muestran la importancia de las células iNKT en la respuesta frente a tumores. Se ha estudiado el efecto de la α -GalCer en líneas tumorales, incluidas las de melanoma, timoma, carcinoma y sarcoma (Hayakawa, Godfrey et al. 2004) (Smyth, Crowe et al. 2002) (Kawano, Cui et al. 1997). Parece que la producción de IFN- γ por las células iNKT es primordial para la activación de las células NK y de la actividad de linfocitos citotóxicos (Chan, Paliwal et al. 2001) (Smyth, Crowe et al. 2002) (Heller, Fuss et al. 2002). También la producción de IL-12 por las APCs vía CD40L es estimulada por las iNKTs en los modelos tumorales (Kitamura, Iwakabe et al. 1999) ((Fujii, Shimizu et al. 2003).

En humanos se han realizado ensayos clínicos en fase I, mediante la administración directa de α -GalCer (Giaccone, Punt et al. 2002), o bien de DCs cargadas con α -GalCer (Nieda, Okai et al. 2004). En ambos estudios se produce una disminución transitoria en los niveles de células iNKTs y NKs junto con aumentos transitorios en las citoquinas séricas. En el estudio con DCs cargadas con α -GalCer se observó un aumento de IFN- γ e IL-12 en el suero así como un aumento en la activación de células T y NKs y un incremento en la citotoxicidad mediada por NKs (Nieda, Okai et al. 2004).

4. Papel de las células NKT en alergia y asma.

El asma bronquial es una enfermedad crónica inflamatoria que afecta a los pulmones y cuya prevalencia está en aumento principalmente en los países occidentales. Existen diversos tipos de asma, siendo el más común de ellos el asma alérgico (provocado por alergias). Otros tipos de asma estarían inducidos por diversos factores como virus, contaminación, estrés o ejercicio físico.

En general, el asma alérgico se caracteriza por hiperreactividad y broncoconstricción de las vías respiratorias provocada por la contracción del músculo liso bronquial y/o por el aumento en la producción de *mucus*. Esta inflamación de las vías respiratorias va asociada a una respuesta predominantemente Th2, en la que se produce IL-4 (que aumenta la síntesis de IgE), IL-5 (que incrementa el crecimiento y diferenciación de eosinófilos), IL-9 (que aumenta la diferenciación de mastocitos) e IL-13 (que aumenta la producción de mucus e induce hiperreactividad de las vías

respiratorias). Por lo tanto, las células Th2 específicas de un alérgeno controlan y amplifican la respuesta alérgica inflamatoria en el asma y constituyen un factor de riesgo para el desarrollo del mismo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las células iNKT pueden producir grandes cantidades de citoquinas tanto Th1 como Th2 al activarse ya sea en presencia o ausencia de un ligando exógeno. Por lo tanto, estas células tendrían el potencial de inhibir o exacerbar las reacciones de tipo alérgico. Este hecho unido a la continua exposición de los órganos respiratorios a patógenos, alérgenos o a la contaminación ambiental, favorecería la posible activación de las células iNKT y el aumento de la inflamación alérgica de las vías aéreas.

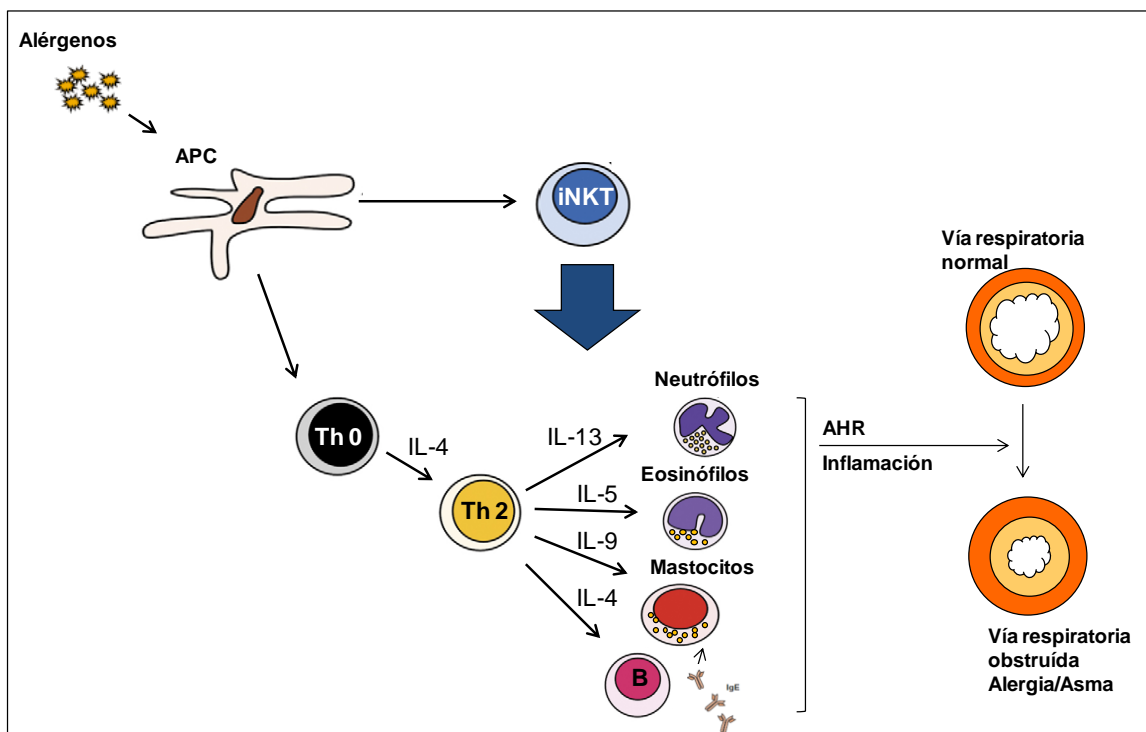


Figura 16. Acción de las células Th2 y de las células iNKT en el desarrollo de AHR (hiperreactividad de las vías aéreas) y de inflamación de las vías respiratorias. Las citoquinas Th2 producidas por las células Th2 específicas de antígeno inducen la activación de células plasmáticas productoras de IgE, de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos. Las células iNKT activadas por factores ambientales o por citoquinas, contribuyen en la inducción de la AHR. (Adaptado de Iwamura y Nakayama 2010).

Efectivamente, aunque las células T CD4⁺ convencionales restringidas por MHC de clase II están consideradas las principales responsables de la patogénesis del asma, por su amplio repertorio de receptores con potencial para reaccionar contra alérgenos, diversos trabajos en modelos murinos de asma muestran el importante

papel de las células iNKT en el desarrollo de la inflamación alérgica de las vías respiratorias, no sólo inducida por alérgenos sino también por otros estímulos independientes a la respuesta Th2 (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009). Sin embargo, estos mecanismos descubiertos en ratón todavía no se han aclarado en pacientes asmáticos, existiendo una gran controversia en los estudios realizados (Iwamura, Nakayama et al. 2010).

4.1. Células iNKT en asma alérgico experimental.

La hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) es una característica fundamental del asma, puesto que está presente en todas las formas del mismo y se correlaciona con el grado de severidad de la enfermedad. En los modelos experimentales la AHR puede ser medida por la pérdida en la función pulmonar causada por la inhalación de alérgenos. Con este modelo de asma alérgico experimental se demostró el papel fundamental de las células iNKT en el desarrollo de la AHR. La hiperreactividad e inflamación de las vías respiratorias inducida por **ovoalbúmina (OVA)** no se produce en ratones deficientes en células iNKT (ratones CD1d1^{-/-} y ratones J α 18^{-/-}). Al transferir células iNKT productoras de IL-4 e IL-13 a los ratones deficientes J α 18^{-/-} o al administrar IL-13 a los ratones CD1d1^{-/-} se restaura la AHR. Es decir, la producción de IL-4 e IL-13 por las células iNKT V α 14 potencia la respuesta asmática incrementando la acción de las células Th2 específicas para OVA en los pulmones (Akbari, Stock et al. 2003) (Lisbonne, Diem et al. 2003).

Cabe destacar la existencia de una población de iNKTs CD4⁺ que expresa el receptor IL-17 B específico para la **IL-25** y que es indispensable para la inducción de AHR en el modelo de asma alérgico. Estas células iNKTs fueron detectadas en los pulmones y secretaban principalmente IL-13 y quimiocinas Th2 al ser estimuladas *in vitro* con IL-25 (Fort, Cheung et al. 2001; Angkasekwinai, Park et al. 2007) (Tamachi, Maezawa et al. 2006).

El grupo de Meyer et al. demostró que la activación de células iNKT en ratones *naive* por **glicolípidos** específicos (α -GalCer y glicolípidos de *Esfingomonas*) podía inducir directamente AHR e inflamación de las vías aéreas, de forma independiente a las células T CD4⁺, eosinófilos y linfocitos B (Meyer, Goya et al. 2006).

Además de los glicolípidos específicos descritos, la mayoría de los extractos de **polvo** domésticos contienen antígenos capaces de activar tanto hibridomas de células

iNKT V α 14, como líneas celulares humanas V α 24. Los extractos del polvo tienen capacidad adyuvante en el modelo murino de asma inducido por OVA dependiente de células iNKT V α 14. Al administrar el extracto de polvo doméstico junto con OVA se produce un aumento en la producción de citoquinas en los pulmones de los ratones por parte de las células iNKT y de las células CD4⁺, mostrando un efecto sinérgico de ambos tipos celulares en la secreción de citoquinas Th2 y de IL-17A (Wingender, Rogers et al. 2011).

Junto a los estudios basados en la respuesta de las células iNKT frente a alérgenos (OVA) o glicolípidos existen diversos trabajos acerca de la influencia de otros factores en la activación de estas células. Por ejemplo, contaminantes como el **ozono** se han asociado con el empeoramiento de las respuestas asmáticas. El grupo de Pichavant et al. (Pichavant, Goya et al. 2008) demostró que las células iNKT del pulmón de los ratones eran necesarias para la inducción de asma inducido por ozono a través de IL-17. Además, iNKTs activadas por antígenos **víricos** estimulan la producción de IL-13 por los macrófagos, aumentando la AHR y la producción de mucus e induciendo enfermedad pulmonar crónica cuando se produce una activación persistente de esta vía (Kim, Battaile et al. 2008).

Tabla 2. *Papel de las células iNKT en diferentes modelos de asma murino. (Adaptado de Matangkasombut et al., 2009).*

Modelo	Estímulo pulmonar	Efectos	Necesidad de:		Población de iNKTs:	
			iNKT	T CD4 ⁺	Marcador	Citoquina
Alérgeno	OVA	AHR, eos, metaplasia mucosa	Sí	Sí	CD4 ⁺	IL-4/IL-13
IL-25 + Alérgeno	OVA + IL-25	AHR, eos	Sí	Sí	IL-17RB ⁺ CCR4 ⁺	IL-4/IL-13
Lípidos	α GalCer, GSL-1, 1'	AHR, eos, neu, linf	Sí	No	iNKT	IL-4/IL-13/ IL-17?
Virus	Virus Sendai	AHR, mac, metaplasia mucosa	Sí	No	CD4 ⁻	IL-13
Contaminantes	Ozono	AHR, neu	Sí	No	NK1.1 ⁻	IL-17
Alérgeno	Polvo doméstico + OVA	AHR, eos, neu	Sí	Sí	iNKT	IL-4/IL-13/ IL-17

linf, linfocitos; mac, macrófagos; neu, neutrófilos.

En oposición a los trabajos que apuntan a las células iNKT como responsables de las respuestas alérgicas en modelos murinos, existen algunos estudios que muestran resultados contrarios. Por ejemplo, ratones triples knock-out que presentan exclusivamente células iNKT y células CD8⁺ activadas de forma constitutiva, no desarrollan una respuesta alérgica estándar (Das, Eynott et al. 2006). Por otro lado, al administrar α -GalCer intravenosa a ratones sensibilizados a OVA se inhibe la AHR, la eosinofilia y la producción de IL-4 e IL-5, induciéndose un perfil Th1 protector (Hachem, Lisbonne et al. 2005). Una posible explicación a estas discrepancias podría ser de carácter ambiental, por la mayor susceptibilidad de los ratones CD1d1^{-/-} a ciertas infecciones o bien por las diferencias en los sistemas experimentales utilizados, por ejemplo la forma de administrar α -GalCer.

4.2. Células iNKT en pacientes asmáticos.

Junto a los resultados obtenidos en ratón se han realizado múltiples estudios sobre el papel de las células iNKT en el asma en humanos. Para ello, se ha investigado principalmente el número de estas células en pacientes asmáticos. En un trabajo inicial publicado en 2006 (Akbari, Faul et al. 2006) se obtuvieron resultados sorprendentes en los que se mostraban porcentajes muy altos de células iNKT (de más del 60% en algunos casos) entre las células T CD4⁺ del BAL de pacientes asmáticos. Este hecho no se observaba ni en pacientes con sarcoidosis ni en controles sanos. A partir de entonces, por lo menos 14 estudios han analizado el número de células iNKT en el BAL, biopsias endobronquiales o en los esputos de pacientes asmáticos. Diez de estos estudios concluyeron que existía un mayor número de células iNKT en los pulmones de pacientes asmáticos o con enfermedad obstructiva crónica en relación a los controles sanos (Akbari, Faul et al. 2006) (Sen, Yongyi et al. 2005) (Pham-Thi, de Blic et al. 2006) (Hamzaoui, Cheik Rouhou et al. 2006) (Yamamoto, Okamoto et al. 2007) (Russano, Agea et al. 2008) (Kim, Battaile et al. 2008) (Matangkasombut, Marigowda et al. 2009) (Reynolds, Barkans et al. 2009) (Koh and Shim 2010). Sin embargo, cuatro de ellos no hallaron dichas diferencias (Motalithas, Croudace et al. 2007) (Vijayanand, Seumois et al. 2007) (Thomas, Lilly et al. 2006) (Bratke, Julius et al. 2007). No está clara la razón de tanta controversia pero podría deberse a las distintas técnicas utilizadas para identificar las células iNKT o el tipo de muestra en la que se realizó el análisis; por ejemplo, en las muestras de esputo no siempre aparecen células de las vías respiratorias bajas.

En los estudios que muestran un aumento en el número de células iNKT en las vías respiratorias de pacientes asmáticos existe una gran variabilidad entre los porcentajes encontrados. Estas diferencias podrían depender del grado de severidad del asma. En el trabajo realizado por Matangkasombut et al. (Matangkasombut, Marigowda et al. 2009) los pacientes con asma severo mostraron de forma general, un incremento en el número de iNKTs en el BAL respecto a los individuos con asma controlado, aunque estos últimos presentaban niveles mayores que los controles sanos. Además, sugieren que la ausencia de células iNKT en los pulmones de algunos pacientes asmáticos no es un indicativo de que estas células no sean relevantes en las reacciones asmáticas, puesto que incluso un bajo número de células iNKT, si están activadas, son capaces de producir AHR significativa.

Asimismo, los resultados en humanos son consistentes con los de ratón, puesto que ambos muestran una rápida fluctuación en el número de iNKTs en el estado basal y tras la administración de alérgenos. Algunos grupos incluso señalan que probablemente se esté subestimando el número de células iNKT ya que el TCR se *down-regula* cuando las células se activan, haciéndose indetectable para los anticuerpos.

Se desconoce si las células iNKT activadas migran de los órganos linfoides a los pulmones o si por el contrario, se activan y proliferan en el pulmón de los pacientes asmáticos. Recientemente se ha descrito que las células iNKT residen de forma constitutiva en la microvasculatura pulmonar del ratón en lugar del propio tejido pulmonar. Estas células iNKT, al ser activadas por extractos glicolipídicos procedentes de paredes microbianas (administrados por vía intranasal), pueden extravasarse y formar granulomas inflamatorios con gran cantidad de eosinófilos. Además, las iNKTs son capaces de activar DCs, que a su vez estimulan y diferencian linfocitos CD4 a Th2 específicos frente a antígenos proteicos asociados a los lípidos suministrados. En última instancia se induce una susceptibilidad alérgica en la que al suministrar antígenos solamente proteicos se produce inflamación alérgica de las vías respiratorias independiente de células iNKT (Scanlon, Thomas et al. 2011).

4.3. Reconocimiento de lípidos procedentes de pólenes por células iNKT.

Un factor a tener en cuenta en la función de las células iNKT en las respuestas inflamatorias alérgicas es el reconocimiento y activación de estas células frente a

componentes lipídicos presentes en los alérgenos. En general, el papel de los lípidos en las respuestas alérgicas ha sido poco estudiado hasta la actualidad y la mayoría de los trabajos se han centrado en el análisis de los componentes proteicos presentes en alérgenos como el polen.

4.3.1. Importancia de los lípidos en la estructura y función de los granos de polen.

Los granos de polen están formados por una cubierta externa que contiene un alto porcentaje de lípidos con ácidos grasos (AGs) saturados e insaturados. Estos lípidos juegan un papel importante en el transporte del contenido del polen a través de las membranas y son esenciales en la reproducción sexual de las plantas superiores (Mariani and Wolters-Arts 2000); además tienen una función indispensable como primera barrera de defensa ante las condiciones ambientales adversas.

En general, la pared del grano de polen se encuentra subdividida en tres estratos principales, variando entre especies la cantidad relativa de cada uno de ellos: 1) **exina**, es la capa más externa, compuesta principalmente por la esporopolenina que es un polímero muy estable que contiene AGs de cadena larga y fenilpropanoides. La exina se haya interrumpida por aberturas denominadas **poros**; 2) **intina**, capa interna formada principalmente por celulosa y 3) **cubierta polínica**, compuesta por lípidos, proteínas, pigmentos y compuestos aromáticos, que rellenan las cavidades de la exina (Edlund, Swanson et al. 2004).

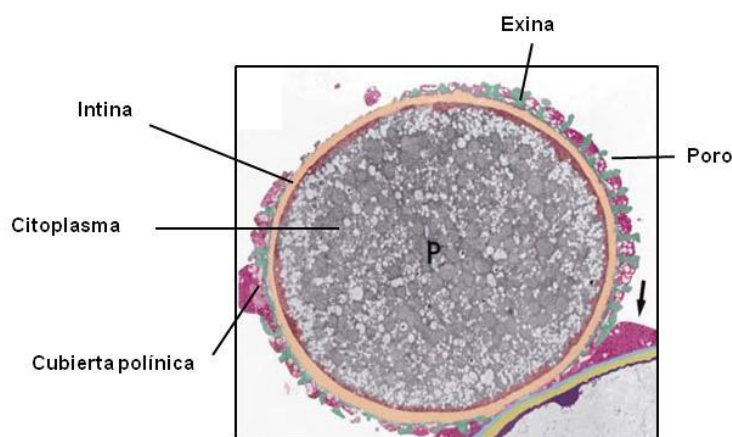


Figura 17. Grano de polen fotografiado al microscopio electrónico de transmisión. Intina (amarillo), exina (verde), cubierta polínica (rosa). (Edlund et al., 2004).

El polen del olivo (*Olea Europaea*) junto con el de gramíneas ha sido reconocido como uno de los más alergógenos en la Europa Mediterránea, por lo cual, las zonas de máximo cultivo presentan una alta prevalencia de individuos alérgicos a estos pólenes. Respecto a su morfología los granos de polen de olivo son prácticamente esféricos, con un tamaño de 18 a 25 μm y una superficie formada por una red de retículas amplias e irregulares que contienen gran número de poros (Fig. 18a).

La composición lipídica del polen de olivo presenta como especies predominantes: fosfatidilcolina (PC), diacilglicerol (DGs), triacilglicerol (TGs) y AGs libres, tanto en el polen maduro como en el polen germinado (Rodríguez-Rosales and Donaire 1988). Además, el ácido linoleico (18:2), linolénico (18:3) y palmítico (16:0) son los AG predominantes en la composición de los PLs, GLs y TGs. Sin embargo, los monogliceroles (MGs), DGs y AG libres contienen un mayor porcentaje de ácidos láurico (12:0) y mirístico (14:0) en sus cadenas acílicas (Fig. 18b y c).

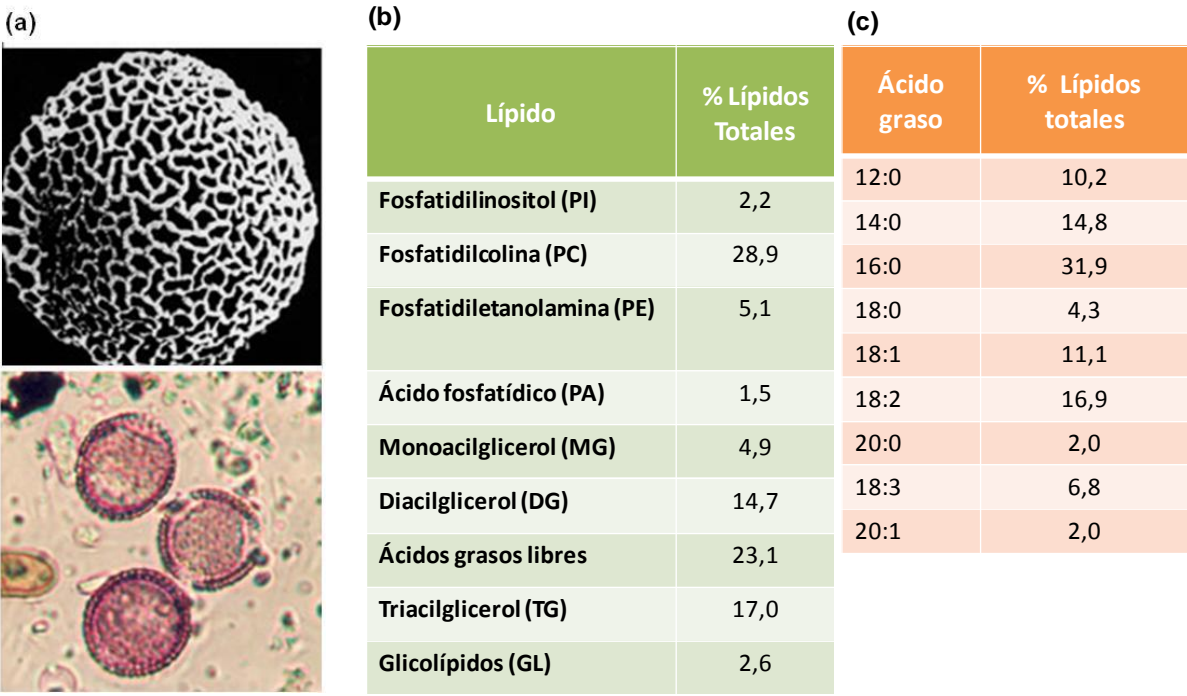


Figura 18. a) Grano de polen de olivo. b) Composición lipídica del polen de olivo maduro (Rodríguez-Rosales y Donaire, 1987). c) Composición de ácidos grasos (AG) de los lípidos del polen de olivo maduro (Rodríguez-Rosales, 1990).

4.3.2. Captura de granos de polen y presentación de sus componentes lipídicos por moléculas CD1.

La mayoría de las proteínas de pólenes que producen sensibilización residen en el citoplasma y son liberadas rápidamente al medio produciendo una respuesta inmune inmediata. Los estudios tradicionales sugieren que receptores no específicos del tipo de las C-lectinas y de las integrinas se unen rápidamente a glicoproteínas de la superficie del polen induciendo la fagocitosis del grano de polen entero o bien de gránulos derivados del mismo (Grote 1999) (Currie, Stewart et al. 2000).

Tanto el tracto respiratorio superior como el inferior contienen macrófagos y DCs que juegan un papel crucial en la sensibilización de células T y en la respuesta frente a alérgenos inhalados (Jahnsen, Moloney et al. 2001) (Bertorelli, Bocchino et al. 2000) (Agea, Forenza et al. 1998). Ambos tipos celulares tienen el potencial de expresar moléculas CD1. De esta forma, se ha observado que la mucosa bronquial de individuos asmáticos tiene un mayor número de células **CD1a⁺** en comparación con los individuos control (Bertorelli, Bocchino et al. 2000). Además, existe una mayor expresión de las moléculas **CD1a y CD1d** en las DCs CD86⁺ del tracto respiratorio de individuos alérgicos al polen de ciprés (Agea, Forenza et al. 1998) (Spinozzi, Agea et al. 1998). También se ha descrito un enorme incremento de DCs **CD1c⁺** HLA-DR⁺ en la mucosa bronquial durante la inflamación de tipo alérgico (Bertorelli, Bocchino et al. 2000). Todos estos trabajos señalan hacia un posible papel de las moléculas CD1 en el reconocimiento de componentes lipídicos presentes en los alérgenos.

Por otra parte, el grupo de Spinozzi describió que los **PLs** de la membrana del polen de ciprés eran capaces de mediar una interacción rápida entre los granos de polen y las DCs de la mucosa (Agea, Russano et al. 2005). En estudios de microscopía electrónica, observaron que a veces los PLs de la membrana del grano de polen se disponían en protuberancias cilíndricas hexagonales que no formaban una estructura en bicapa. Las cadenas acilo de los PLs que quedaban expuestas hacia el exterior podían interaccionar con la hendidura de la molécula CD1, estabilizando el contacto entre la DC y el grano de polen (Aguilar, Ortega-Pierres et al. 1999) (Bedinger, Hardeman et al. 1994).

Todos estos estudios proporcionan evidencias sobre la expansión *in situ* y la activación de APCs CD1⁺ en los procesos inflamatorios alérgicos y sobre el

reconocimiento de componentes lipídicos presentes en los alérgenos por células del sistema inmune (Tanaka, Morita et al. 1995) (Bukowski, Morita et al. 1999).

4.3.3. Reconocimiento de lípidos procedentes de pólenes por linfocitos iNKT.

Existen pocos estudios acerca del reconocimiento de lípidos procedentes de polen por linfocitos T específicos. El trabajo realizado por el grupo de Spinozzi en individuos alérgicos al polen de ciprés muestra la presencia de linfocitos T específicos frente a **fosfatidilcolina (PC)** y **fosfatidiletanolamina (PE)**, restringidos por moléculas CD1a y CD1d (Agea, Russano et al. 2005). Este fue el primer trabajo que describió la existencia de poblaciones de células T humanas capaces de reconocer PLs procedentes de polen en pacientes alérgicos. Los clones de células T eran capaces de aumentar la producción de IgE, con reacción cutánea inmediata frente a los PLs del ciprés en los individuos alérgicos. La mayoría de los clones de NKTs restringidos por CD1d y específicos para PC y PE eran de tipo II o no invariantes, aunque también se encontró algún clon de células iNKT V α 24⁺V β 11⁺.

Se han identificado también clones de **linfocitos T $\gamma\delta$** restringidos por CD1d en individuos alérgicos. Estos clones reconocen **PE** derivada del polen de olivo y de ciprés, en particular PE 16:0/18:2 y PE 18:2/18:2; secretan citoquinas tanto Th1 como Th2 e inducen secreción de IgE *in vitro* e *in vivo*. Este estudio sugiere un posible papel regulador de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la respuesta alérgica inicial producida en las mucosas (Russano, Agea et al. 2006).

En línea con los estudios acerca del reconocimiento de lípidos de polen, cabe destacar también la existencia de mediadores lipídicos o **fitoprostanos** presentes en el extracto acuoso del polen de abedul (*Betula alba*), capaces de modular la función de las DCs inhibiendo la producción de IL-12 y potenciando la respuesta Th2 de células T *naïve* (Traidl-Hoffmann, Mariani et al. 2005).

Como se ha mencionado anteriormente la mayoría de los extractos de **polvo** doméstico contienen antígenos capaces de activar de forma CD1d-dependiente, tanto hibridomas de células iNKT V α 14 como líneas celulares humanas V α 24. Parece que estos antígenos derivados del polvo no provienen de ácaros ni tampoco corresponden a glicoesfingolípidos, pero podrían proceder de agentes bacterianos. La mayoría de las células iNKT reactivas a los extractos de polvo eran CD4⁺ productoras de IL-17,

destacando el papel de este subtipo celular en la AHR (Wingender, Rogers et al. 2011).

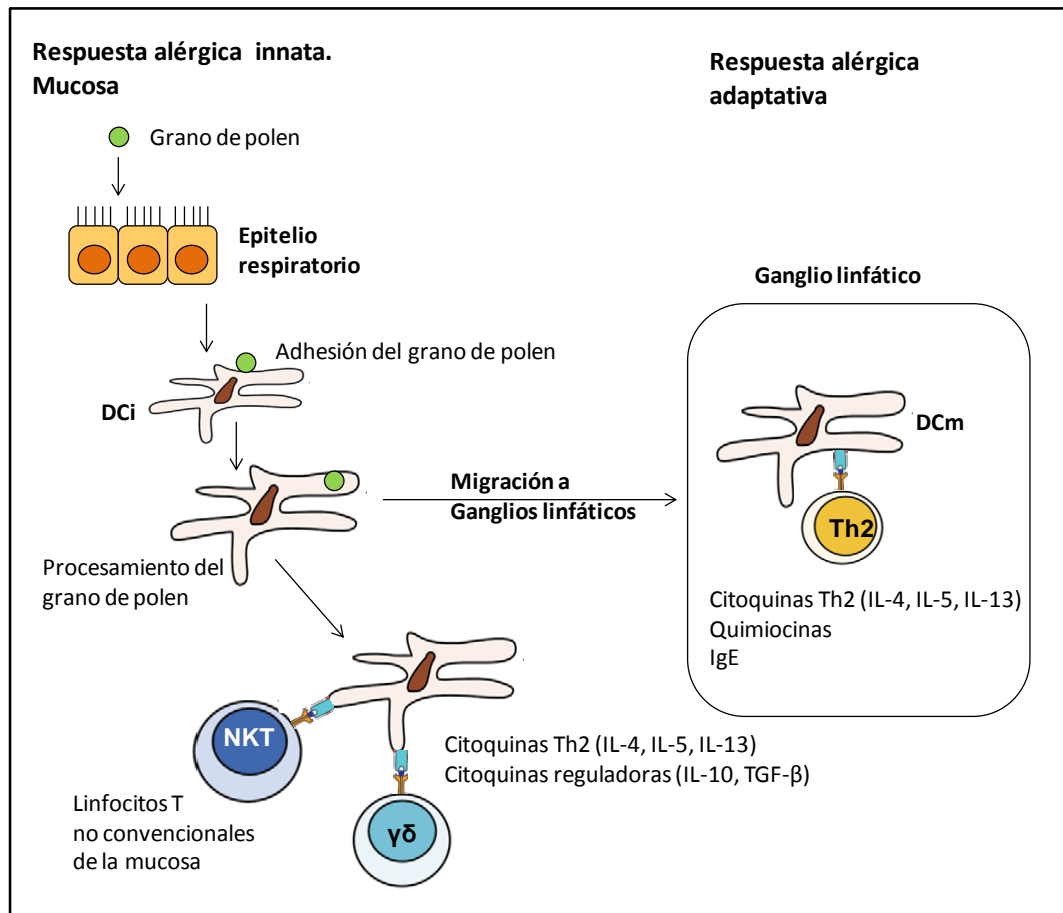


Figura 19. Papel del sistema inmune innato y adaptativo propuesto en la respuesta alérgica al polen de ciprés. En la mucosa respiratoria, receptores CD1 de células del sistema inmune innato capturan y reconocen PLs del grano de polen. Citoquinas del entorno, como IL-12 e IL-5 contribuyen a la expansión de células iNKT y células T $\gamma\delta$, que secretan grandes cantidades de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13). Tras esta fase inicial, DCs y basófilos migran a los ganglios linfáticos, donde los alérgenos son presentados a linfocitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ convencionales, que amplifican la respuesta produciendo citoquinas de tipo Th2, quimiocinas y cooperación para la producción de IgE por las células B. (Adaptado de Russano et al., 2008).

En resumen, estos trabajos ponen de manifiesto la existencia de multitud de antígenos en el medio ambiente (polen, polvo) con capacidad para activar células NKT y contribuir a la exacerbación de las respuestas alérgicas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Debido a su potente capacidad para regular respuestas de tipo Th1 y Th2 se planteó el posible papel de las células iNKT en la regulación de la respuesta inmune frente a alérgenos. Se ha descrito que estas células participan en la patogenia de diferentes respuestas alérgicas, tanto en modelos animales como en humanos. Sin embargo se desconoce mucho acerca de los mecanismos que subyacen a estas respuestas y especialmente sobre la naturaleza de los antígenos lipídicos reconocidos por las células iNKT. En este trabajo se planteó como objetivo general el reconocimiento por células iNKT de lípidos de polen presentados por moléculas CD1d.

Teniendo en cuenta estos factores, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la respuesta de células iNKT humanas frente a antígenos lipídicos procedentes del polen del olivo.
2. Análisis de la expresión de CD1d en células presentadoras de antígeno (APCs) expuestas a polen de olivo y a la fracción lipídica del polen de olivo.
3. Estudio de la actividad citolítica y producción de citoquinas por células iNKT frente a células dendríticas tratadas con lípidos del polen de olivo.
4. Análisis y separación de los componentes lipídicos del polen de olivo.
 - 4.1. Efecto sobre la expresión de CD1d en APCs.
 - 4.2. Respuesta de células iNKT frente a células dendríticas tratadas con los distintos lípidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Separación de lípidos de polen de olivo (*Olea europaea*).

1.1. Extracción de la fracción total de lípidos del polen de olivo.

Los granos de polen de olivo fueron obtenidos de ALK-ABELLÓ (Madrid, España) (Lot. A-1579).

Para la extracción de la fracción lipídica del polen se realizaron 5 incubaciones de 1 hora con éter dietílico (Panreac), en agitación suave y a temperatura ambiente. En cada incubación se añadieron 50 ml de éter por cada 2 gramos de polen. Después de cada una de las agitaciones se realizó una centrifugación de 20 minutos a 5000 rpm y 4 °C, decantando el sobrenadante en un vaso de precipitado.

Al final del proceso se recogió todo el volumen de éter dietílico con el extracto lipídico del polen y se secó en atmósfera de nitrógeno (N₂). El extracto lipídico fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO).

1.2. Extracción de la fracción acuosa del polen.

La fracción acuosa del polen fue generada mediante la incubación de los granos de polen en RPMI-1640 (30 mg/ml) durante 30 min a 37 °C, seguido de centrifugación a 3345 g durante 20 min y filtración (0,2 µm).

1.3. Cromatografía en capa fina (TLC) de los lípidos totales del polen de olivo.

El extracto lipídico total extraído de 1 gr de polen de olivo fue disuelto en 200 µl de cloroformo:metanol (2:1, vol.) y aplicado sobre una placa de silica previamente deshidratada a 110 °C durante 1 hora.

Los lípidos se aplicaron a lo largo de una banda continua a 2 cm del borde inferior de la placa y se dejaron secar durante 2-3 minutos. A continuación, se llevó la placa a una cubeta de vidrio sellada (para crear una atmósfera cerrada) con los disolvente orgánicos: hexano/éter/ácido acético (70/30/1, vol.). La placa se colocó en la cubeta con la línea de aplicación hacia abajo, en contacto con los disolventes y se dejó correr durante 40 min aproximadamente. Al sacar la placa de la cubeta se marcó con un lápiz el desplazamiento del frente para poder calcular después la migración relativa (Rf) de cada especie aislada en la TLC. Se dejó la placa 20 min en la campana de gases para la evaporación de los disolventes y, a continuación, se revelaron las distintas bandas con vapores de yodo. El yodo en escamas se había precalentado previamente 1 hora a 90-100 °C en otra cubeta independiente para obtener yodo gaseoso. Se introdujo la placa unos segundos dentro de esta cubeta para teñir las distintas bandas separadas en la TLC y se marcaron con un lápiz para su posterior extracción.

La placa se dejó secando 1 hora para la evaporación total del yodo y seguidamente se rascaron las bandas obtenidas con la ayuda de una espátula. Cada una de ellas se echó en un tubo de vidrio para extraer los lípidos de la silica. La extracción se realizó de la siguiente manera:

1. Lavados con cloroformo:metanol (2:1, vol.) (4 lavados de 2 ml cada uno).
2. Lavados con cloroformo:metanol (1:1, vol.) (4x2 ml).
3. Lavados con metanol (4x2 ml)

Después de cada lavado se realizó agitación con vórtex y centrifugación (30-60 segundos) y se recogió el sobrenadante en un tubo limpio. A continuación, cada especie aislada fue secada en atmósfera de N₂ y disuelta en DMSO.

1.4. Cromatografía bidimensional en capa fina (TLC-bidimensional) de los lípidos polares del polen de olivo.

A partir de la extracción de la banda de lípidos polares provenientes de la TLC de lípidos neutros, se disolvió la cantidad necesaria de los mismos en cloroformo:metanol (2:1, vol.). A continuación, se aplicó gota a gota (dejando unos segundos después de cada aplicación para que fuera absorbido completamente) todo el volumen de lípidos polares. Se cargó todo en un solo punto situado en una de las

esquinas de la placa, a 2 cm del borde inferior y del borde lateral. La placa, al igual que en el *apartado 1.2.*, había sido precalentada 1 h a 110 °C para su deshidratación.

Después de aplicar los lípidos y dejarlos secar en la placa, se procedió a la separación de los mismos en la primera dimensión. Se colocó la placa con el punto de aplicación en la parte inferior de una cubeta (igual que en la primera TLC de lípidos totales) con los siguientes disolventes orgánicos: cloroformo/metanol/ NH_3 (65/25/5, vol.). Se dejó correr durante una 1 h aproximadamente y después se dejó secar durante 20 min para la completa evaporación de los disolventes.

Seguidamente, se colocó la placa en la cubeta con los disolventes orgánicos de la 2ª dimensión: cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/ H_2O (30/40/10/10/5, vol.). La placa se colocó con las fracciones separadas en la 1ª dimensión hacia abajo en la cubeta. Al igual que antes, se dejó 1 h de incubación y 20 min de secado antes de teñir con los vapores de yodo (cubeta 1 h a 90-100 °C). Se marcaron con un lápiz las distintas manchas que aparecieron al revelar con el yodo y se dejó evaporar el yodo de la placa durante 1 h. Seguidamente, se rascaron de la sílica las diferentes especies separadas en la TLC- bidimensional. Como anteriormente, cada fracción se puso en un tubo de vidrio para su extracción de la sílica. La extracción se realizó de la misma manera que en el caso de la TLC de lípidos neutros:

1. Lavados con cloroformo:metanol (2:1, vol.) (4x2 ml).
2. Lavados con cloroformo:metanol (1:1, vol.) (4x2 ml).
3. Lavados con metanol (4x2 ml).

Se agitaron y centrifugaron después de cada lavado, recogiendo el sobrenadante en un tubo nuevo. A continuación, cada especie aislada en la TLC-bidimensional fue secada en atmósfera de N_2 y disuelta en DMSO.

1.5. Cuantificación de los lípidos totales y los PLs mediante ensayo de fósforo (P).

Los lípidos y PLs fueron cuantificados mediante un ensayo de P que se realizó de la siguiente manera:

1. Se añadieron 300 µl de H₂SO₄ (10 N) en cada tubo con la muestra o con el estándar para la curva patrón de P (por duplicado). La mezcla se incubó 2 h a 190-200 °C.
2. Se dejó enfriar y se añadieron 1 ó 2 gotas de H₂O₂ al 30%. Se volvió a incubar 2 h a 190-200 °C.
3. Se dejó enfriar y se añadieron los siguientes reactivos en este orden y agitando tras añadir cada uno de ellos: 300 µl de H₂O, 200 µl de molibdato amónico al 5% y 200 µl de reactivo ANSA más metabisulfito sódico y H₂O. Los tubos se dejaron 10-20 min a 80-90 °C hasta que las muestras adquirieron coloración azulada.
4. Por último, se midió la densidad óptica a 830 nm en un espectrofotómetro y los valores de las muestras se interpolaron con los valores de la recta patrón elaborada con la solución estándar de P.

2. Aislamiento de monocitos y diferenciación a células dendríticas y/o macrófagos. Tratamiento con extractos lipídicos derivados del polen de olivo.

2.1. Aislamiento de monocitos.

Los monocitos fueron obtenidos a partir de la fracción tromboleucocitaria de sangre de "Buffy coats" de donantes sanos (Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid). En primer lugar se realizó una centrifugación en gradiente de Ficoll a 800 g durante 45 min y a continuación, se recogió la nube de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) resultante de la centrifugación y se lavaron las células con PBS (tampón fosfato salino) estéril, centrifugando 5 min a 300 g.

Después de eliminar los glóbulos rojos residuales a través de un choque hipotónico con "buffer de lisis", se efectuó la separación de monocitos mediante la incubación de las PBMCs con un anticuerpo anti-CD14 unido a bolas magnéticas (Miltenyi Biotec). La incubación se realizó 15 min a 4 °C (15 µl de anticuerpo por cada 1×10^7 de células). Después de lavar las células con tampón de lavado (PBS estéril al 1% de BSA y 2 mM de EDTA) se disolvieron hasta 1×10^8 millones de células en 500

μl del mismo buffer y se pasaron por la columna magnética (Miltenyi Biotec) previamente hidratada, quedando retenidas en la columna las células CD14 positivas. Tras varios lavados (3 de 3 ml cada uno) se sacó la columna del soporte magnético, y se eluyeron los monocitos con tampón de lavado gracias al émbolo de la columna.

2.2. Diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs).

Los monocitos fueron cultivados durante 5 días en medio RPMI-1640, al 10% de suero bovino fetal (FCS) y 1% de antibiótico/antimicótico, bajo condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, 5% CO₂). Para su diferenciación a iDCs se suplementó a los monocitos con 1000 U/ml de rhIL-4 y 1000 U/ml de rhGM-CSF, renovando medio con citoquinas al 3^{er} día de cultivo.

Algunos experimentos se realizaron en las mismas condiciones de cultivo pero sustituyendo el FCS por suero humano AB (Sigma-Aldrich), también al 10%.

Para madurar las iDCs después de 5 días de diferenciación, éstas se cultivaron con lipopolisacárido (LPS) de *Eschericia coli* a 100 ng/ml durante 48 h.

2.3. Diferenciación de monocitos a macrófagos (Mφ).

Los monocitos fueron cultivados durante 5 días en medio RPMI-1640, al 10% de suero bovino fetal (FCS) o suero humano AB y 1% de antibiótico/antimicótico, bajo condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, 5% CO₂). Los monocitos fueron suplementados con 1000 U/ml de rhGM-CSF, renovando medio con GM-CSF al 3^{er} día de cultivo.

Para obtener macrófagos activados por la vía clásica (CAMφ), se cultivaron los Mφ al 5^o día de diferenciación con 500 U/ml de rhIFNγ durante 48 h. Para obtener macrófagos activados por la vía alternativa (AAMφ) los Mφ fueron suplementados al 5^o día con 1000 U/ml de rhIL-4 durante 48 h.

2.4. Tratamiento de células dendríticas, macrófagos, monocitos y linfocitos de sangre periférica con extractos lipídicos derivados del polen de olivo (*Olea europaea*).

Las células fueron incubadas durante 48 h en presencia o ausencia de:

1. Fracción de lípidos totales del polen de olivo (tras su extracción con éter) a una concentración de 200 ng/ml.
2. Cada una de las fracciones resultantes de la TLC de lípidos neutros: lípidos polares (100 ng/ml), diglicéridos (DGs), ácidos grasos libres (AG libres) y triglicéridos (TGs).
3. Cada uno de los fosfolípidos extraídos de la TLC bidimensional.
4. Extracto acuoso del polen de olivo (1 mg/ml).
5. Ácido retinoico all-trans (ATRA, Sigma-Aldrich) a 100 nM.

En algunos experimentos (donde se indica) se añadieron los lípidos desde el primer día de diferenciación de monocitos a iDCs y/o M ϕ durante los 5 días.

2.5. Tratamiento de iDCs con agonistas y antagonistas de PPAR γ .

Se realizaron ensayos de activación de PPAR- γ con el agonista de PPAR- γ : Rosiglitazona (Alexis Biochemicals), y con el antagonista irreversible y específico de PPAR- γ : GW9662 (Alexis Biochemicals).

Las iDCs tratadas por un lado con los lípidos del polen y por otro con Rosiglitazona (2,5 μ M), fueron cultivadas en presencia o ausencia del inhibidor de PPAR- γ , GW9662 (5 μ M).

Los estímulos se añadieron o bien durante 48 h sobre las iDCs diferenciadas o bien desde el primer día de diferenciación desde monocito a iDC (durante 5 días).

3. Expansión y aislamiento de células iNKT ($V\alpha 24^+V\beta 11^+$).

PBMCs obtenidas a partir de centrifugación en gradiente de ficoll, fueron cultivadas durante 15 días en RPMI-1640, al 1% de antibiótico/antimicótico y 10% de FCS, en presencia de rhIL-2 (100 U/ml) y PBS-57 (análogo de la α -GalCer) (100 ng/ml). Las células se cultivaron a una densidad de 1×10^6 /ml en condiciones estándar de cultivo (5% CO_2 , 37 °C) y se renovó el medio junto con los estímulos 2 veces por semana.

Después de 2 semanas en cultivo se determinó el grado de proliferación de células iNKT y se procedió a su aislamiento. Se utilizaron los anticuerpos anti- $V\alpha 24$ -FITC y anti- $V\beta 11$ -PE (Beckman Coulter), anti-Fluoresceína (FITC) y anti-Ficoeritrina (PE) unidos a bolas magnéticas (Miltenyi Biotec). Los pasos para el aislamiento fueron los siguientes:

1. Incubación de las PBMCs con el anticuerpo anti- $V\beta 11$ -PE ($10\mu l/1 \times 10^7$) durante 15 min a 4 °C.
2. Lavado con buffer (PBS, 1% BSA, 2 mM de EDTA) e incubación con anti-PE unido a bolas magnéticas ($20\mu l/1 \times 10^7$), 10 min a 4 °C.
3. Lavado y paso por la columna magnética (quedando retenidas en el imán las células $V\beta 11^+$).
4. Eliminación de las esferas magnéticas unidas a anti-PE mediante incubación con el reactivo *Multisort Release Reagent* (Miltenyi Biotec) ($10 \mu l/ml$ de células en suspensión) durante 10 min a 4 °C.
5. Lavado y detección de la reacción con *Stop Reagent* ($30\mu l$ /total de células), 10 min a 4 °C.
6. A continuación, se incubaron las células con anti- $V\alpha 24$ -FITC ($10\mu l/1 \times 10^7$) durante 15 min a 4 °C.
7. Lavado e incubación con anti-FITC unido a bolas magnéticas ($20\mu l/1 \times 10^7$) 10 min a 4 °C.
8. Lavado y paso por la columna magnética, quedando pegadas en el imán las células $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$.

En los últimos experimentos se realizó el aislamiento de células iNKT con el anticuerpo anti-Vα24Jα18 unido a bolas magnéticas (Miltenyi Biotec), de forma que el proceso se redujo a una sola incubación ($10\mu\text{l}/1 \times 10^7$, 15 min a 4 °C) y una sola columna magnética. Con este proceso se obtuvo además una mayor viabilidad celular.

Después del protocolo de separación se realizó el análisis por citometría de la población obtenida, logrando rendimientos de pureza muy altos (93-96% de células iNKTs).

4. Anticuerpos utilizados.

Los anticuerpos utilizados en los marcajes de membrana, intracelulares y en las inmunofluorescencias son los que se detallan en la *Tabla 3*.

Marcaje de membrana: se usaron de 2×10^5 a 5×10^5 células por marcaje. Las células se resuspendieron en PBS y se les añadió 1 μg de anticuerpo directo (1:100) (conjugado con fluorocromo) o indirecto (no conjugado). Se incubaron 20 min a 4 °C en oscuridad y seguidamente se lavaron con PBS. En el caso de los anticuerpos indirectos se añadió 1 μg (dilución 1:100) de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo de interés. Tras 2 lavados con PBS las células se resuspendieron en un volumen de 300-400 μl de PBS y finalmente se procedió al análisis por citometría de flujo (FACSCalibur).

Marcaje intracelular: se utilizaron 5×10^5 células por marcaje. Primero, las células fueron marcadas con los anticuerpos de membrana (como se describe en el apartado anterior) y tras un lavado fueron fijadas con paraformaldehído 2% durante 5 min a Tª ambiente. A continuación, las células se lavaron con PBS, 1800 rpm 3 min y se permeabilizaron con PBS al 0,1% de saponina, 1% de BSA y 2mM de EDTA, 15 min a Tª ambiente. Se añadió el anticuerpo 1^º, 20 min a 4 °C. Después se realizaron 2 lavados con PBS-0,1% de saponina. Seguidamente, se incubaron las células con el anticuerpo 2^º, 20 min a 4° C (en los casos en que fue necesario). Por último, se realizó un lavado con el buffer-0,1% de saponina y un lavado final con PBS.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los marcajes de membrana e intracelulares por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Diana	Origen	Características (isotipo, especie, tipo, conjugado)
Anti-CD1d (clon CD1d42)	CD1d humano	BD-Pharmingen	IgG1, monoclonal purificado, ratón, PE
Anti-CD1d (clon CD1d42)	CD1d humano	BD-Pharmingen	IgG1, monoclonal purificado, ratón
Anti-CD1b (clon 4A76)	CD1b humano	Immunotech	monoclonal purificado, ratón
Anti-CD1c (clon L161)	CD1c humano	Immunotech	monoclonal purificado, ratón
OKT6	CD1a humano	American Type Culture Collection (ATCC)	IgG1, monoclonal, sobrenadante de hibridoma, ratón.
Anti-HLA-DR (clon TU36)	HLA-DR humano	BD-Pharmingen	IgG2b, monoclonal purificado, ratón, PE
Anti-CD86 (clon 2331 FUN-1)	CD86 humano	BD-Pharmingen	IgG1, monoclonal purificado, ratón, FITC
Anti-CD80 (clon I307.4)	CD80 humano	BD-Pharmingen	IgG1, monoclonal purificado, ratón, PE
W6/32	HLA-I (A,B, C) humano	American Type Culture Collection (ATCC)	IgG2a, monoclonal purificado, ratón
Dímero CD1d:Ig	TCR V α 24-V β 11 humano	BD-Pharmingen	IgG1, monoclonal purificado, ratón
Anti-CD14 (clon 47-3D6)	CD14 humano	Immunostep	IgG1, monoclonal purificado, ratón, FITC
Anti-CD14-microbeads	CD14 humano	Miltenyi Biotec	IgG2a, monoclonal purificado, ratón, microbeads
Anti-CD19 (clon HD37)	CD19 humano	Dako	IgG1, monoclonal purificado, ratón, FITC
Anti-CD3 (clon SK7)	CD3 humano	Becton Dickinson	IgG1, monoclonal purificado, ratón, PE
Anti-Vα24-microbeads	V α 24-J α 18 humano	Miltenyi Biotec	IgG1, monoclonal purificado, ratón, microbeads
Anti-Vα24 (clon C15)	V α 24 humano	Beckman Coulter	IgG1, monoclonal purificado, ratón, FITC
Anti-Vβ11 (clon C21)	V β 11 humano	Beckman Coulter	IgG2a, monoclonal purificado, ratón, PE
Control de isotipo		Immunostep	IgG1, monoclonal purificado, ratón, FITC y PE
Secundario anti-IgG de ratón	IgG (H+L) de ratón	Invitrogen	IgG, monoclonal purificado, cabra, Alexa Fluor 488
Secundario anti-IgG de ratón	IgG (H+L) de ratón	Invitrogen	IgG, monoclonal purificado, cabra, PE

Inmunofluorescencia: las DCs se cultivaron sobre cubres estériles desde el 1^{er} día de diferenciación a una densidad de 2×10^5 /ml. Se fijaron en PBS al 3% de paraformaldehído, 15 min a T^a ambiente y después se realizaron 2 lavados con PBS. A continuación, las células se permeabilizaron con PBS al 0,3% de saponina, 10% de FCS, 5 min a T^a ambiente. Antes del marcaje se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS al 10% de suero normal de cabra.

El marcaje se realizó con Zenon Complex (Invitrogen): 1 µg del anticuerpo de interés (anti-CD1d) sin conjugar, fue mezclado con 5 µl de *Zenon human IgG labeling reagent* (fragmentos Fab) conjugado con Alexa Fluor 488. La mezcla fue incubada 5 min a T^a ambiente. A continuación, se añadieron 5 µl de Blocking Reagent a la mezcla y se dejó 5 min a T^a ambiente.

Las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD1d unido a los fragmentos Fab-Alexa Fluor 488 (Zenon complex) en PBS al 10% de suero normal de cabra, durante 30 min a T^a ambiente y protegido de la luz. A continuación se realizaron 2 lavados y una última fijación con PBS al 4% de paraformaldehído, 15 min a T^a ambiente, seguida de 2 lavados.

Los cubres se montaron sobre portas en medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories). Las células teñidas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A1.

5. PCR cuantitativa a tiempo real.

Se cuantificó la expresión específica del RNAm de: CD1A, CD1B, CD1C y CD1D, utilizando GAPDH como gen “housekeeping”, con el sistema de sondas Taqman (Roche). Para ello fueron necesarios los siguientes pasos previos.

5.1. Extracción de RNA.

- Homogenización de las células con TRIZOL (Invitrogen), 1 ml por cada 5×10^6 de células, 5 min a T^a ambiente.

- Adición de cloroformo (200 µl/ml TRIZOL) mezclando bien el tubo y dejándolo en reposo durante 2-3 min a Tª ambiente.
- Centrifugación de la mezcla a 12000 g, 15 min a 4 °C, obteniendo dos fases bien diferenciadas: una fase orgánica en la parte inferior del tubo y una fase acuosa con el RNA en la parte superior. Se recogió la fase acuosa y se transfirió a otro tubo.
- Precipitación del RNA mediante isopropanol (100 µl/ml de TRIZOL). Se agitó el tubo con la mezcla y se incubó 10 min a Tª ambiente. Posteriormente se centrifugó 12000 g, 10 min a 4 °C. Apareció un precipitado de RNA en el fondo del tubo.
- Lavado con etanol al 75 % y centrifugación a 7500 g, 5 min a 4 °C.
- Por último, se disolvió el RNA obtenido en agua DEPC (dietil pirocarbonato) 0,01%, 10 min a 55-60 °C y se cuantificó por espectrofotometría en NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer) a partir de 2 µl de muestra.

5.2. Obtención de cDNA a partir de RNA.

Para obtener el DNA complementario (cDNA) a partir del RNA aislado previamente, se utilizó el kit *First Strand cDNA Synthesis for RT-PCR (AMV)* (Roche Applied Science).

Se utilizaron 2 µg de RNA en la siguiente mezcla de reacción (volumen final de 20 µl): Enzima AMV-Transcriptasa reversa (20 U/µl; 0,8 µl), inhibidor de RNAsa (50 U/µl; 1 µl), dNTPs (1 µM; 2 µl), *random primers* (1,6 µg/ µl; 2 µl), MgCl₂ (5 µM; 4 µl), tampón de reacción 1x (2 µl) y agua destilada estéril.

Se incubó la mezcla durante diez minutos a 25 °C y posteriormente a 42 °C durante una hora. A continuación, para desnaturalizar la AMV-RTsa se incubó la mezcla a 99 °C durante cinco minutos y se mantuvo en hielo durante otros cinco minutos.

5.3. Amplificación de genes de interés a partir del cDNA por PCR.

La mezcla de reacción para todas las PCRs fue: cDNA molde (5 µl; 1 µg), Taq polimerasa (5 U/µl; 1 µl) (Roche Applied Science), dNTPs (200 nM; 0,3 µl), cebadores (10 µM; 0,6 µl), tampón con Mg²⁺ (10x) y agua destilada estéril hasta completar el volumen final (15 µl).

Las condiciones de amplificación de todas las PCR fueron: 35 ciclos, 58 °C.

5.4. PCR cuantitativa a tiempo real.

Los niveles de RNA mensajero de los genes de CD1D, CD1A, CD1B y CD1C fueron analizados mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para su detección y cuantificación se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores y sondas Taqman diseñadas con la *Universal Probe Library* (Roche Applied Science):

CD1d (sonda 57):

Cebador (5'-3')	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierdo	22	1091-1112	58	45	GAACTGAAGAAGCAAGTGAAGC
Derecho	21	1170-1191	58	52	GGGTAGAATCCTAGAACATGG

CD1a (sonda 75):

Cebador (5'-3')	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierdo	20	838-857	59	40	CCCATGAATTGCAGTTTGAA
Derecho	20	902-921	59	50	AGCTTCCTGAGACCTTTCCA

CD1b (sonda 37):

Cebador (5'-3')	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierdo	20	406-425	60	45	CAAGACTTTGCCGGTGATTT
Derecho	22	479-500	59	50	AAGCTTACTATGGCACCTCCAG

CD1c (sonda 12):

Cebador (5'-3')	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierdo	20	314-333	60	50	TTCTCCCAGGTGGTGACAAT
Derecho	21	382-402	60	43	CCAGGATTGGTTGACAAATGA

GAPDH (sonda 60):

Cebador (5'-3')	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierdo	20	76-95	60	60	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC
Derecho	20	168-187	59	50	ACGACCAAATCCGTTGACTC

La reacción fue realizada en un volumen final de 20 µl con los siguientes reactivos: *FastStart Universal Probe Master (Rox)* 2x (10 µl) (Roche Applied Science), oligonucleótidos cebadores (200 nM; 0,4 µl), sonda (100 nM; 0,2 µl), agua destilada (4 µl) y cDNA (~0,5 µg; 5 µl)

Las reacciones fueron realizadas por duplicado con un control negativo de reacción sin la enzima RTsa, siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de 95 °C 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C 15 segundos y por último 60 °C 1 min. El sistema utilizado fue ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) de la Unidad de Genómica de la UCM. La expresión de los distintos genes fue calculada utilizando como control interno la expresión de GAPDH y se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001) para cuantificar la expresión relativa de cada gen respecto al control. Para cada gen la eficiencia de amplificación fue calculada utilizando una curva con diluciones seriadas 1/10 de cada CDNA.

6. Ensayos funcionales.

6.1. Ensayo de citotoxicidad.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se libera rápidamente ante un daño de la membrana celular. Se midió la cantidad de LDH liberada al medio

al cultivar células iNKT (células efectoras) con células diana: iDCs, monocitos, M ϕ o células transfectantes CD1d.221. Se usaron 2 ratios distintas de células efectoras: células diana (2,5:1 y 7,5:1) y se co-cultivaron en condiciones estándar durante 4 h en medio con bajo porcentaje de suero (1% FCS).

A continuación, se utilizó el kit de detección de LDH (Roche) para calcular el índice de lisis de las células diana por las células iNKT. La actividad LDH se midió con la siguiente reacción enzimática: primero, el NAD⁺ se reduce a NADH/H⁺ en la conversión de lactato a piruvato catalizada por la LDH. En un 2º paso, el catalizador (diaforasa) transfiere H/H⁺ del NADH/H⁺ a la sal de tetrazolio que se reduce a formazán (producto final coloreado) (Ver figura 22).

Como control positivo se incubaron las células con “Solución de lisis” (5 μ l/pocillo) durante 15 min, y como control basal de lisis se utilizaron las células diana solas (sin iNKTs). Todas las células se incubaron con la mezcla de reacción (100 μ l/pocillo) 30 min a 15-25 °C, protegiendo la placa de la luz. Para detener la reacción se añadieron 50 μ l de “Solución Stop” y se procedió a leer la placa en un espectrofotómetro (Microplate Autoreader Bio-Tek, Cultek) a una absorbancia de 490 nm.

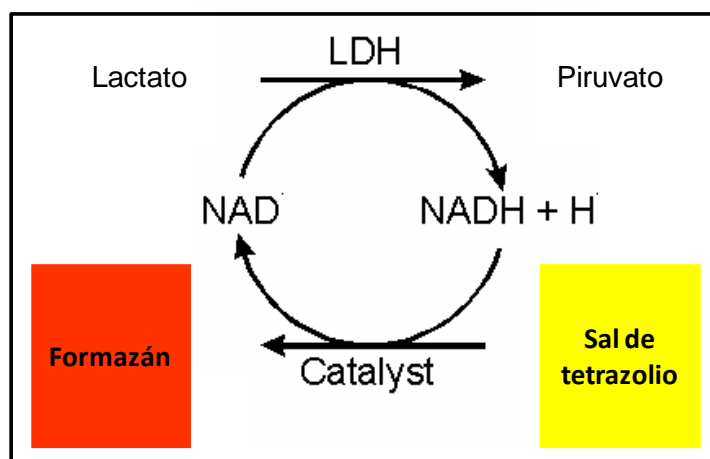


Figura 20. Esquema representativo de la reacción enzimática de la LDH.

El porcentaje de lisis específica fue calculado teniendo en cuenta la absorbancia a 490 nm de la lisis basal, la lisis máxima y la obtenida en cada ratio, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lisis} = (\text{Ratio Abs 490 nm} - \text{Abs Basal}) / (\text{Max Abs} - \text{Abs Basal})$$

6.2. Producción de citoquinas por ELISA y ELISpot.

ELISA: iDCs tratadas y sin tratar fueron cultivadas con células iNKT a una ratio de 1:1 y tras 48 h se recogieron los sobrenadantes para la detección de IL-4 e IFN- γ (R&D Systems), IL-12 e IL-10 (Immunotools). También se analizó la secreción por iDCs de IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10 (Immunotools) tras 48 h en cultivo con los distintos estímulos. Se utilizó un sistema de ELISA tipo sándwich, con el anticuerpo anti-citoquina adherido a la placa. Se añadió la cantidad de sobrenadante o de estándar establecida por el manual haciéndose duplicados, y se incubó durante 2 h a T^a ambiente. Después de diversos lavados, se añadió el anticuerpo anti-citoquina conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y se incubó 1 h a T^a ambiente. A continuación, se agregó el sustrato y tras 15-30 min se paró la reacción y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro (Microplate Autoreader Bio-Tek, Cultek) a una absorbancia de 450 nm.

Mediante análisis de regresión se obtuvo una recta enfrentando los valores del logaritmo de la densidad óptica contra el logaritmo de las concentraciones de IL-4 o IFN- γ procedentes del estándar. A partir de esta recta se interpolaron los valores de densidad óptica obtenidos en cada caso.

ELISpot: PBMCs fueron cultivadas durante 12 días en presencia o ausencia de lípidos totales de olivo (200 ng/ml) o con PBS-57, como control de proliferación de iNKTs. A día 12, las células fueron re-estimuladas y cultivadas durante 24 h, en placas previamente recubiertas con el anticuerpo de captura anti-IL-4 o anti-IFN- γ (Millipore) por triplicado. Para detectar la secreción de estas citoquinas por las células iNKT, se lavaron las placas con PBS y se añadió el anticuerpo de detección anti-IL-4 o anti-IFN- γ unido a biotina. La placa se incubó durante 1 h a T^a ambiente, y después de varios lavados se añadió la estreptavidina conjugada a la fosfatasa alcalina (1 h a T^a ambiente, en oscuridad). Por último, se añadió el sustrato BCIP/NBT para revelar los puntos coloreados por la presencia de citoquinas. Todos los reactivos utilizados son de Millipore.

La placa se dejó secar durante 24 h antes de ser analizada en ImmunoSpot Series 45 Micro ELISPOT Analyzer, obteniéndose el número total de células formadoras de puntos por pocillo.

7. Análisis estadísticos.

Los resultados fueron representados como la media \pm desviación estándar (S.D.). Se compararon las medias mediante el test *t*-Student para datos independientes y se representaron las diferencias estadísticamente significativas como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,03$ y *** $p < 0,01$. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa informático Statgraphics.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. La fracción lipídica del polen de olivo (*Olea europaea*) es capaz de activar células iNKT humanas *in vitro*.

Para comenzar este estudio quisimos determinar si la fracción lipídica extraída del polen de olivo era capaz de activar a linfocitos iNKT presentes en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos. Así, PBMCs procedentes de la fracción tromboleucocitaria (*buffy coats*) fueron tratadas con lípidos del polen de olivo para saber si podían proliferar células iNKT al igual que ocurría al tratar estas células con el ligando exógeno de CD1d, α -galactosilceramida (α -GalCer). En estos experimentos las células fueron cultivadas durante 2 semanas en presencia o ausencia de lípidos totales del polen usando como control positivo de proliferación de iNKTs el análogo de la α -GalCer, PBS-57 (Liu, Goff et al. 2006) al que nos referiremos en el texto como α -GalCer.

Observamos que las células iNKT son capaces de proliferar de manera dosis-dependiente en respuesta a los lípidos del polen de olivo en los cultivos de PBMCs. Al analizar el fenotipo de las células iNKT proliferadas con los lípidos del polen obtuvimos entre un 40%-60% de células CD4⁺, de forma similar a las células proliferadas únicamente con IL-2 (60%). En el caso de las iNKTs proliferadas con α -GalCer el porcentaje de células CD4⁺ fue algo mayor (72%) que en las células control (Ver *Fig. 21*)

Para obtener más información acerca de la activación de células iNKT en las PBMCs tratadas con los lípidos de polen de olivo, se midió también la producción de IFN γ e IL-4 después de 10-12 días en cultivo. En ese momento, las células fueron re-estimuladas durante 24 h en presencia o ausencia de los lípidos totales del polen (200 ng/ml) o bien con α -GalCer (100 ng/ml) como control positivo de activación; y a continuación, se midieron las citoquinas por ELISpot. Los resultados muestran un aumento en la producción de IFN γ e IL-4 en las PBMCs tratadas con los lípidos del polen respecto a las células sin tratar (*Fig. 22*).

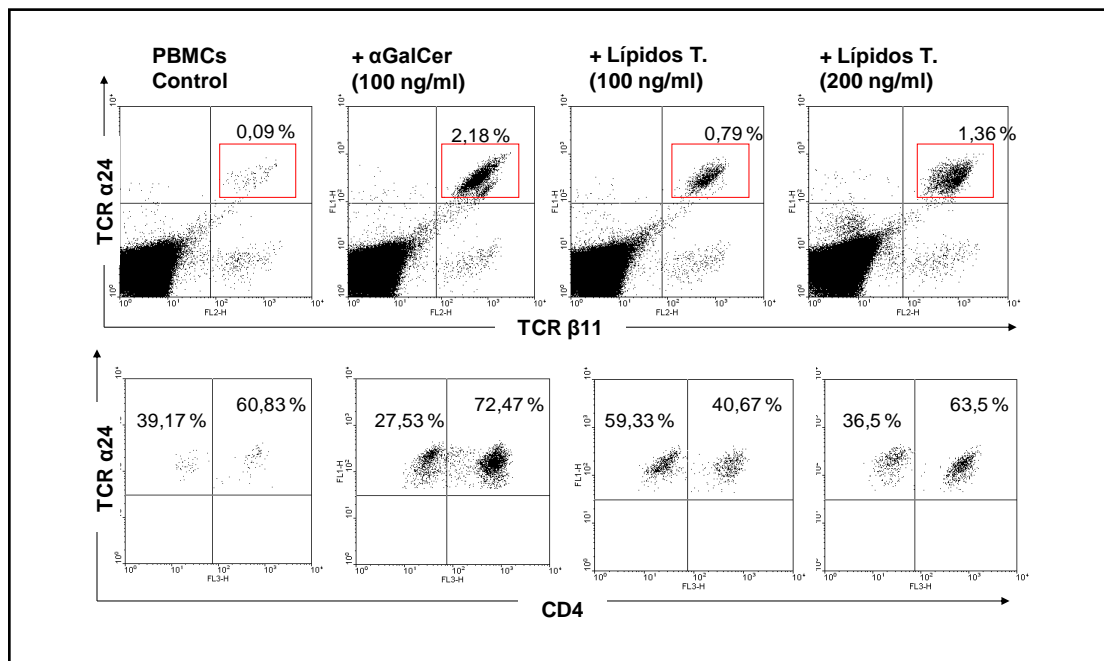


Figura 21. Porcentaje de proliferación de células iNKT marcadas con los anticuerpos anti-TCR $\alpha 24$ y anti-TCR $\beta 11$ en PBMCs estimuladas con lípidos totales del polen de olivo (panel superior). Porcentaje de iNKTs CD4⁺ y CD4⁻ (panel inferior). Experimento representativo de siete donantes diferentes.

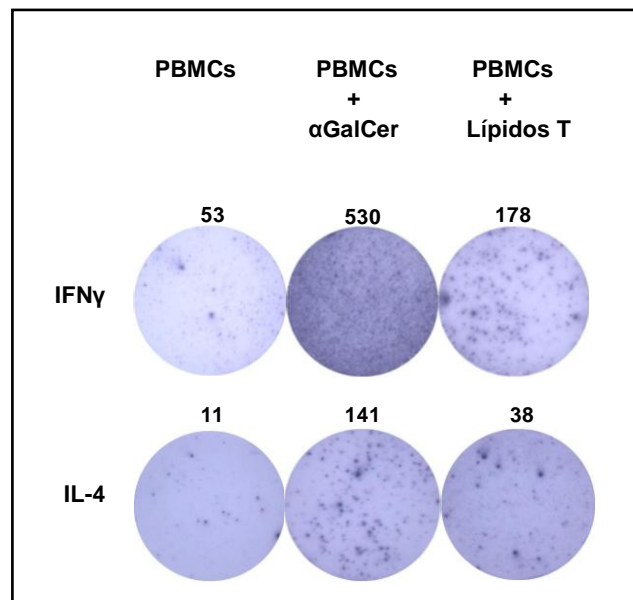


Figura 22. Análisis de células productoras de IFN- γ e IL-4 en PBMCs tratadas con lípidos totales de olivo mediante ELISpot. Los números indican las células productoras de citoquinas. Experimento representativo de tres donantes distintos.

De manera general, los resultados indican que los lípidos de polen de olivo son capaces de activar células iNKT humanas induciendo su proliferación y la secreción de IFN γ e IL-4.

Por otro lado, evaluamos la expresión de la molécula CD1d en linfocitos B y monocitos presentes en PBMCs en ausencia o presencia de los lípidos del polen. La población de monocitos (células CD14⁺) había desaparecido tras 10-12 días en cultivo. Por el contrario, se pudo detectar un pequeño porcentaje de linfocitos B (CD19⁺) que habían sufrido un incremento en la expresión de CD1d en las PBMCs tratadas con los lípidos del polen (*Fig 23*).

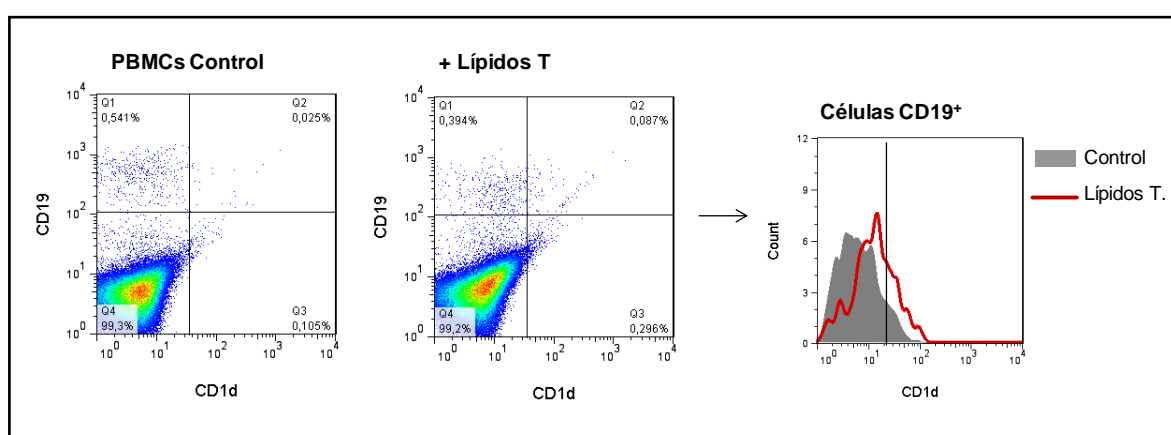


Figura 23. Expresión de CD1d en células CD19⁺ de PBMCs tratadas y sin tratar con lípidos del polen de olivo tras 10-12 días de cultivo. La línea vertical en el histograma representa el control de isotipo. Experimento representativo de dos realizados.

2. Los granos de polen de olivo son capaces de interactuar e inducir cambios fenotípicos en DCs derivadas de monocitos.

Las DCs inmaduras (iDCs) son células con alta capacidad fagocítica y probablemente las principales células presentadoras para las células iNKT *in vivo*; por ello, estudiamos la interacción de estas células con los granos de polen de olivo y los posibles cambios en su fenotipo.

Se añadieron granos de polen de olivo al cultivo de iDCs al 5^o día de diferenciación desde monocito, y se observó el comportamiento de estas células mediante tinción con hematoxilina/eosina tras 15 min, 30 min y 2 h en cultivo. Como se observa en la *figura 24*, las iDCs se adhieren, emiten prolongaciones y rodean a los

granos de polen con su citoplasma, quedando éstos totalmente cubiertos por las células a las 2 h de incubación.

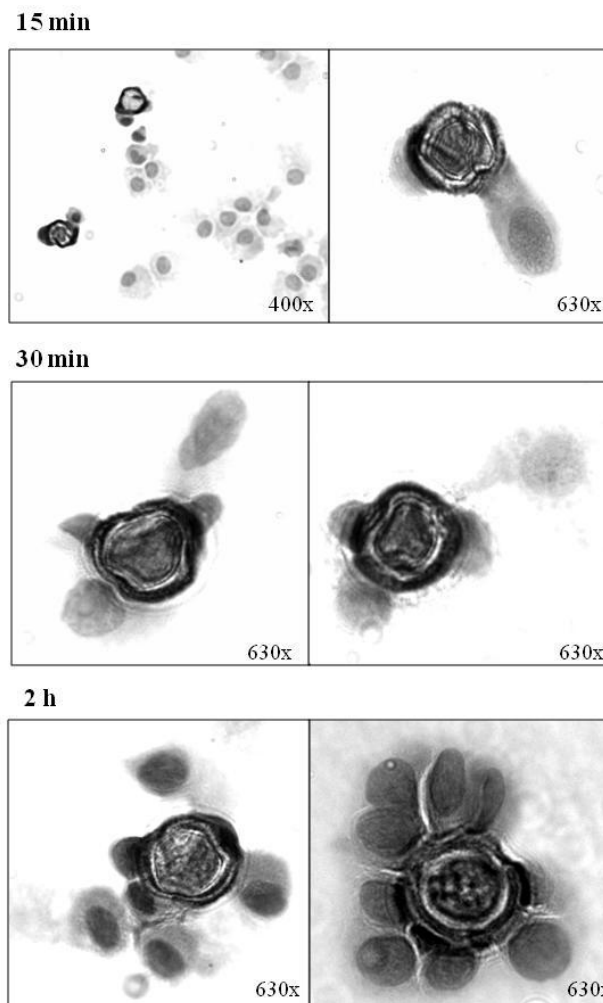
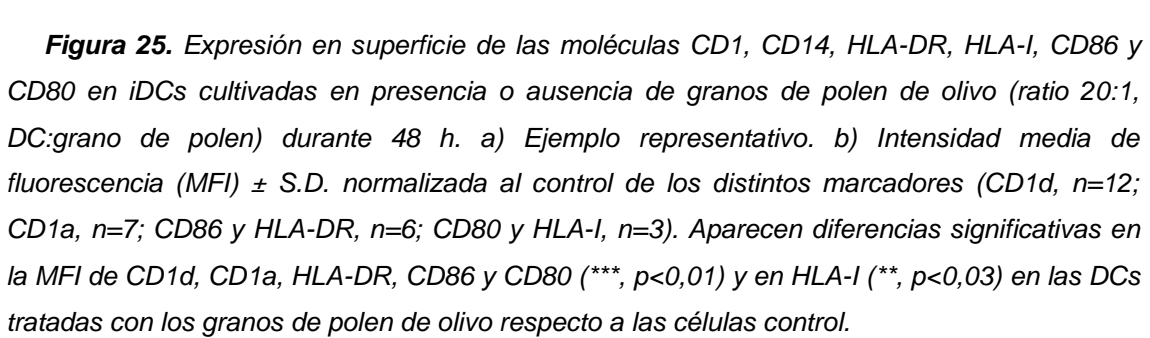


Figura 24. iDCs cultivadas en presencia de granos de polen de olivo (DC:grano de polen, 20:1), teñidas con hematoxilina/eosina y fotografiadas al microscopio óptico a los 15 min, 30 min y 2 h.

Además, se analizó la expresión de las moléculas CD1 y de algunos marcadores de maduración en las iDCs cultivadas en presencia y ausencia de los granos de polen tras 48 h en cultivo. Observamos un incremento significativo en la expresión de CD1d, a la vez que una disminución de CD1a respecto a las células control. Por otro lado, los marcadores de maduración: HLA-I, HLA-DR, CD86 y CD80, incrementan su expresión de forma significativa respecto a las células sin tratar (Fig 25). Es decir, los granos de polen de olivo son capaces de madurar a las iDCs.



71

3. Efecto de los lípidos procedentes del polen del olivo sobre monocitos, linfocitos B y células derivadas *in vitro* de monocitos: células dendríticas (DC) y macrófagos (M ϕ).

Tras haber observado el efecto de los lípidos del polen de olivo sobre iNKTs de sangre periférica y la interacción de los granos de polen con las iDCs, pasamos a estudiar la posible acción de los lípidos sobre las principales células presentadoras de antígeno a través de CD1d: monocitos, células dendríticas (DC), macrófagos (M ϕ) y linfocitos B.

3.1. La fracción lipídica del polen de olivo induce un aumento dosis-dependiente de CD1d en iDCs.

La respuesta observada en la expresión de las moléculas CD1d y CD1a en las iDCs cultivadas en presencia de granos de polen de olivo sugería un posible efecto de los componentes lipídicos del polen sobre la presentación antigénica. Por ello, estudiamos el efecto de la fracción lipídica del polen sobre la expresión de las moléculas CD1 al tratar iDCs.

Se cultivaron iDCs en presencia de los lípidos del polen a distintas concentraciones (50, 100, 200 y 500 ng/ml) durante 48 h. A continuación, se analizó la expresión en superficie de las moléculas CD1d, CD1a y de los marcadores de maduración CD86 y HLA-DR. Asimismo, se determinó la viabilidad celular en las células tratadas con el extracto lipídico mediante marcaje con yoduro de propidio. Como se observa en la *figura 26*, el porcentaje de iDCs viables disminuye de forma dosis-dependiente con los lípidos totales del polen, de forma que al tratar las células a una concentración de 500 ng/ml se obtiene una viabilidad celular menor al 20%. Por lo tanto, se descartó la concentración lipídica de 500 ng/ml por la alta tasa de mortalidad celular producida y se decidió usar la dosis de 200 ng/ml para todos los experimentos posteriores.

Respecto a la expresión en superficie de los marcadores de interés, se aprecia un aumento dosis-dependiente de CD1d, a la vez que una disminución de CD1a en las iDCs tratadas con los lípidos del polen. Por otro lado, la molécula co-estimuladora CD86 también aumenta de forma dosis-dependiente con los lípidos, mientras que la

molécula presentadora de clase II, HLA-DR no sufre ninguna modificación en su expresión (figura 27).

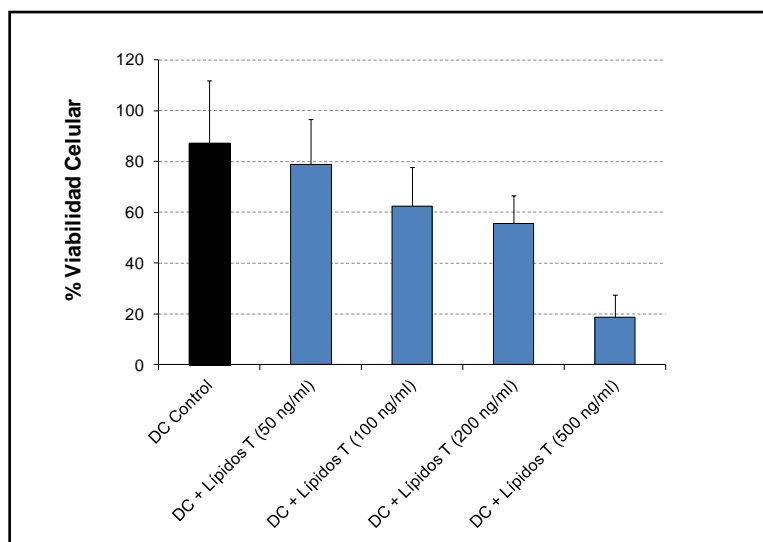


Figura 26. Estudio de la viabilidad de las iDCs tratadas durante 48 h a concentraciones crecientes de lípidos totales del polen de olivo. Se muestra la media \pm S.D. del porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio de tres experimentos independientes.

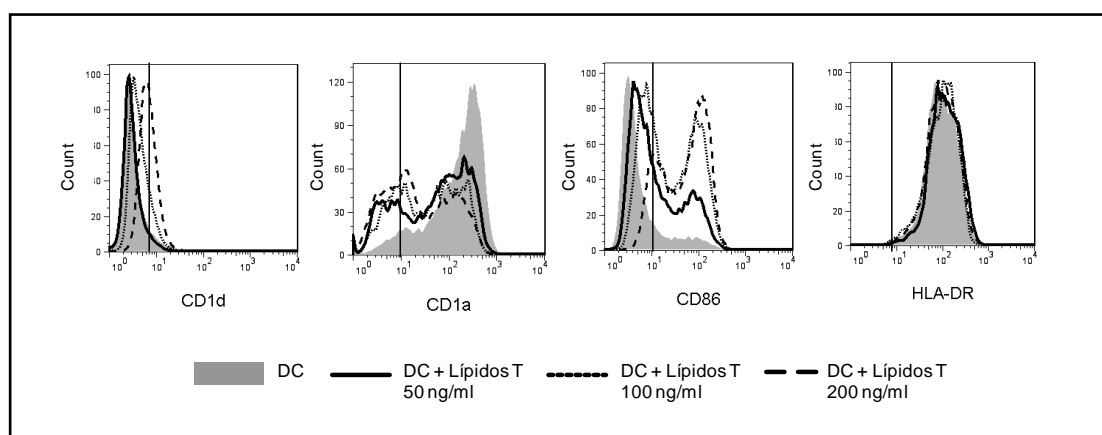


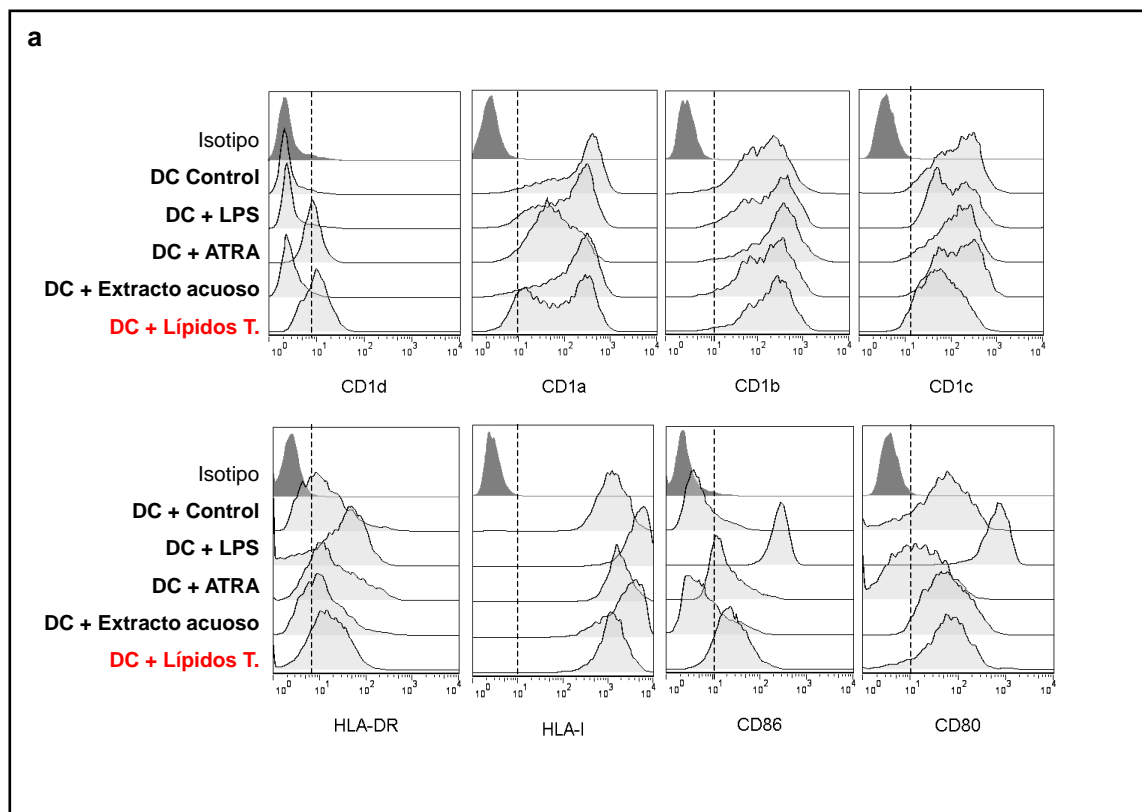
Figura 27. Expresión de las moléculas CD1d, CD1a, CD86 y HLA-DR en DCi tras 48 h de cultivo con distintas concentraciones de lípidos totales de olivo. La barra vertical representa el control de isotipo. Experimento representativo de dos realizados.

Con el fin de caracterizar mejor el efecto y la especificidad de la fracción lipídica sobre las iDCs se comparó su efecto con el del extracto acuoso derivado del polen. Se utilizó LPS como control de maduración y ácido retinoico all-trans (ATRA) como control positivo conocido de aumento transcripcional de CD1d. El ATRA se une a receptores de ácido retinoico (RAR α), traslocándose al núcleo y actuando como

factor de transcripción de distintos genes, aumentando la expresión de CD1d y disminuyendo CD1a (Szatmari, Pap et al. 2006).

Como se muestra en la *figura 28*, los lípidos del polen de olivo producen un aumento significativo de CD1d en la superficie celular, mientras que el extracto acuoso no induce ningún cambio en esta molécula. Además, los lípidos disminuyen la expresión en superficie de CD1a, sin modificar la expresión de CD1b ni CD1c. Las iDCs tratadas con el extracto acuoso no muestran tampoco cambios significativos en ninguna de las moléculas CD1 del grupo I. Por otra parte, el ATRA provoca un marcado incremento en la expresión de CD1d, al mismo tiempo que disminuye CD1a de forma significativa respecto a las células control, como era lo esperado.

Respecto a los marcadores de maduración, se confirma el incremento de la expresión de CD86 en las iDCs tratadas con los lípidos del polen; aumento que no se produce sin embargo, en las células tratadas con el extracto acuoso. No obstante, el extracto acuoso del polen induce un incremento significativo en la expresión de las moléculas de clase I no observado en las iDCs tratadas con los lípidos. Las iDCs cultivadas en presencia de ATRA incrementan de forma significativa CD86 y HLA-DR y disminuyen CD80.



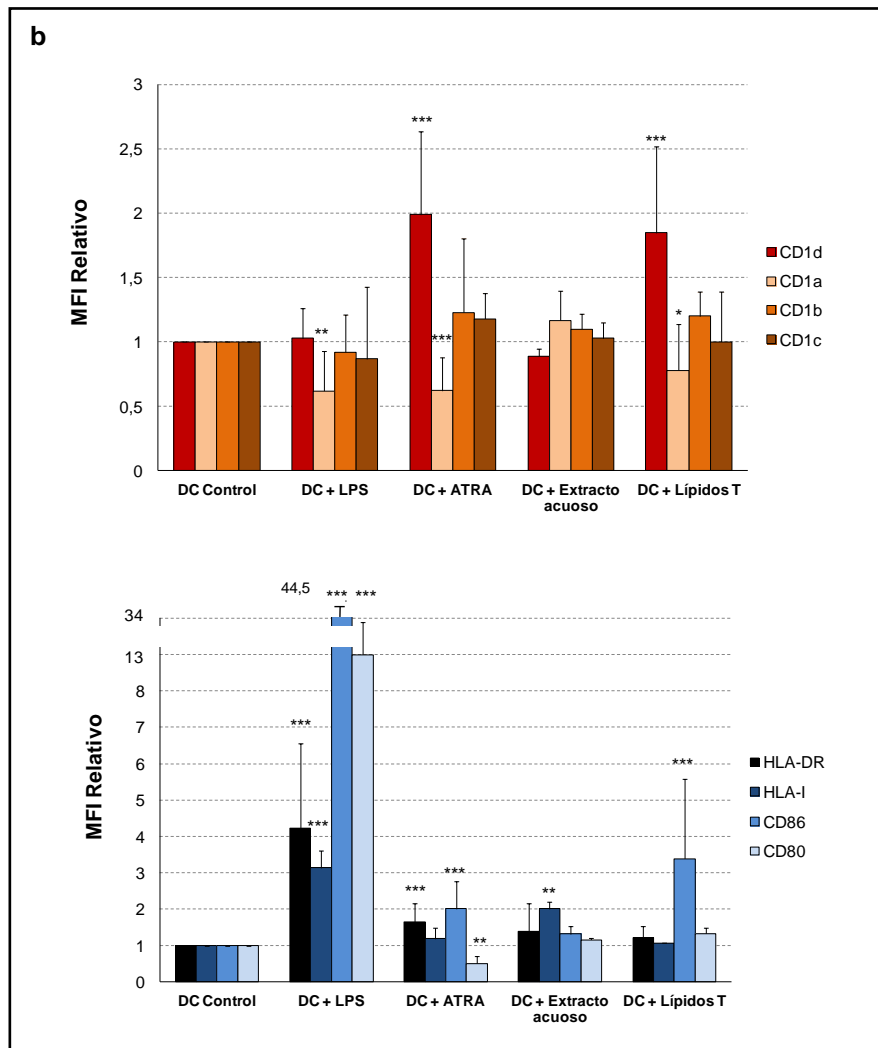


Figura 28. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR, HLA-I, CD86 y CD80 en iDCs control y tratadas con LPS, ATRA, extracto acuoso del polen de olivo y lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. a) Ejemplo representativo. b) MFI relativo \pm S.D. de los distintos marcadores (CD1d, $n=21$; CD1a, CD86 y HLA-DR, $n=14$; CD1b, CD1c, HLA-I y CD80, $n=3$) en las iDCs tratadas con los estímulos. Se observan diferencias significativas en la media de fluorescencia de CD1d en las iDCs tratadas con ATRA y lípidos totales (***, $p<0,01$), CD1a en las iDCs estimuladas con LPS (**, $p<0,03$), ATRA (***, $p<0,01$) y lípidos totales (*, $p<0,05$), HLA-DR y CD80 en las células tratadas con LPS (***, $p<0,01$) y con ATRA (HLA-DR; **, $p<0,01$; CD80; **, $p<0,03$), HLA-I en las DCi estimuladas con LPS (***, $p<0,01$) y extracto acuoso del polen (**, $p<0,03$) y por último CD86 en las células tratadas con LPS, ATRA y lípidos totales del polen (***, $p<0,01$) respecto a las iDCs sin estimular.

Podemos decir que el aumento en la expresión de CD1d y CD86 y la disminución de CD1a en las iDCs son efectos específicos de la fracción lipídica del polen de olivo.

Este efecto de los lípidos del polen sobre las iDCs induce un fenotipo de semi-maduración, que se corresponde con la morfología de las células al microscopio óptico. Como se advierte en la *figura 29*, los lípidos producen un alargamiento de las dendritas característico en las iDCs, recordando un fenotipo propio de células maduras/activadas.

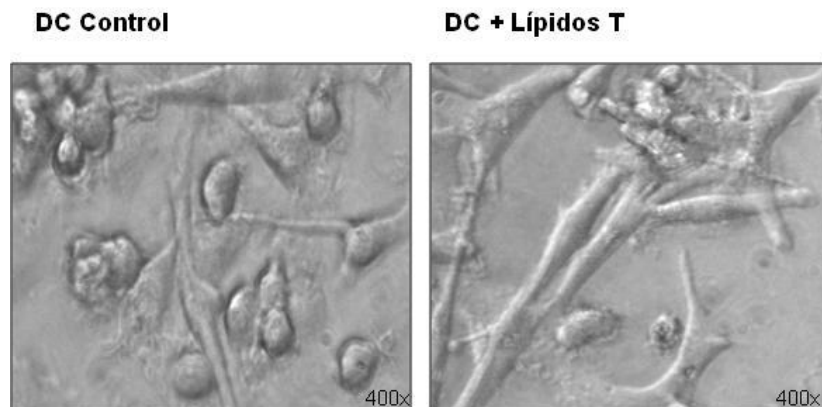


Figura 29. iDCs tratadas con lípidos totales del polen y observadas al microscopio óptico (400x).

A continuación, realizamos una cinética de expresión de CD1d para comprobar a qué tiempos comenzaba el aumento de CD1d en las iDCs tratadas con los lípidos del polen. A las 12 h de cultivo ya se observó un ligero incremento de CD1d en superficie, y este aumento se fue haciendo mayor a las 12, 16 y 24 h, siendo máximo a las 48 h. A partir de las 72 h la viabilidad celular de las iDCs tratadas con el extracto lipídico era muy baja (menor del 30%) por lo que no consideramos este resultado (*Fig. 30*).

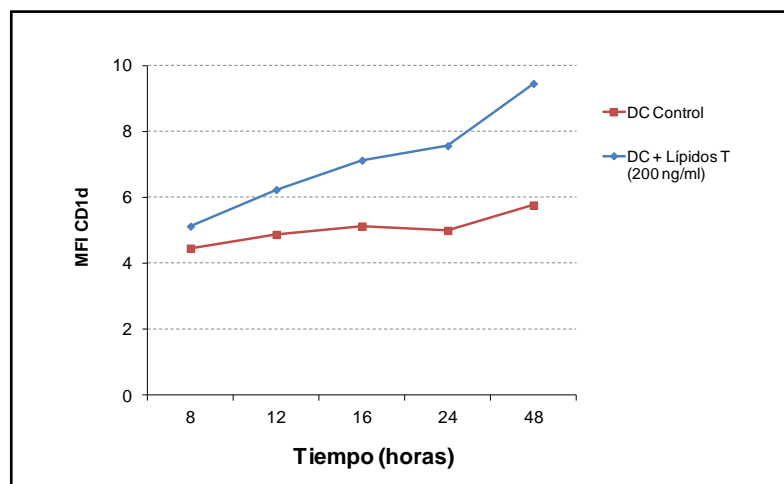
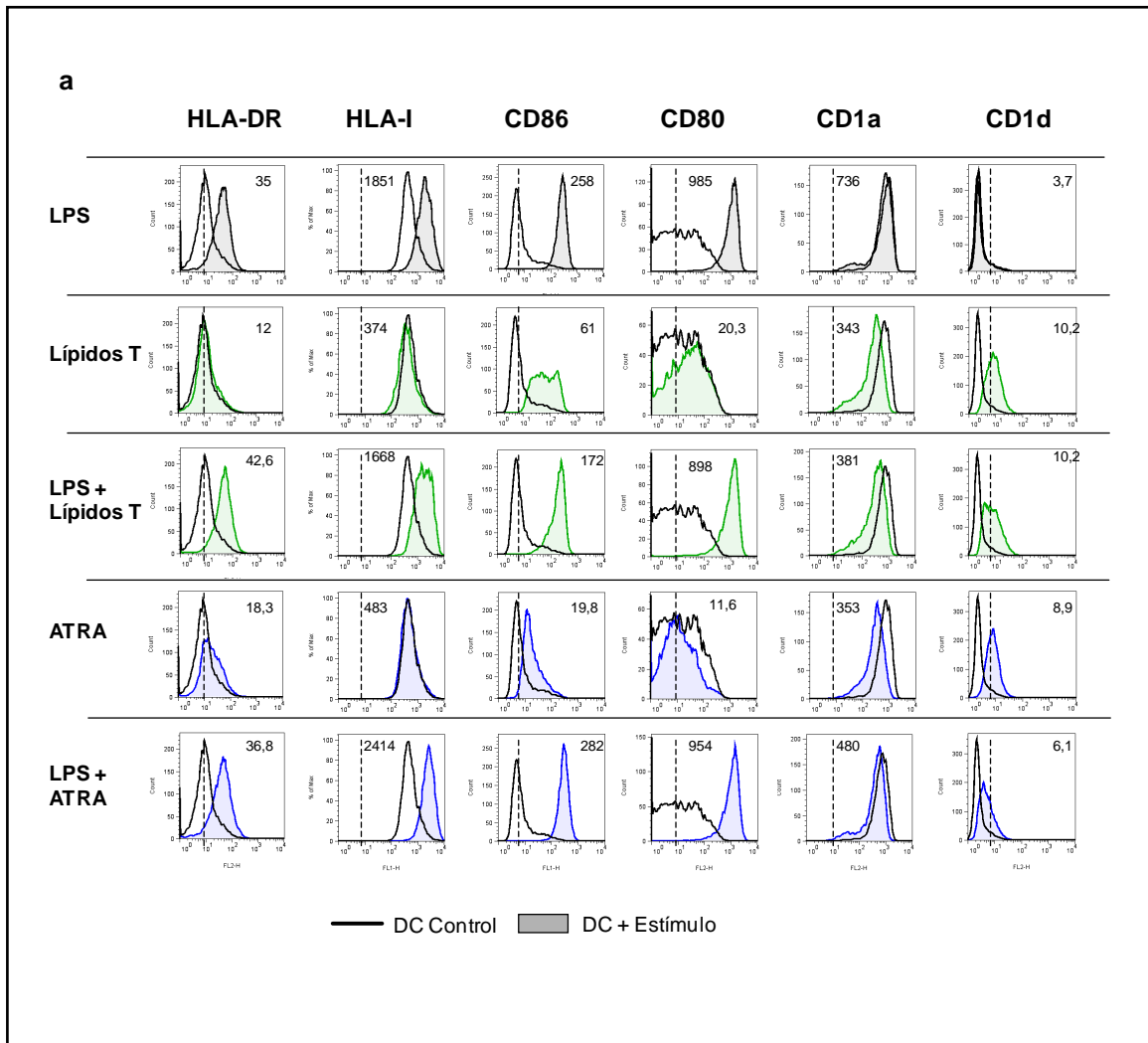


Figura 30. Cinética de expresión de CD1d en iDCs tratadas con lípidos del polen de olivo.

Por otro lado, se analizó si al tratar las iDCs con los lípidos del polen se alteraba la capacidad de estas células para madurar. Para ello, se estimularon las iDCs al 5º día de diferenciación con LPS en presencia o ausencia de los lípidos del polen durante 48 h y se analizó por citometría de flujo si los marcadores de maduración y las moléculas CD1a y CD1d, se veían afectados. Como se puede observar en la *figura 31* no existe una variación significativa de estas moléculas (HLA de clase I, HLA-DR, CD86 y CD80) al madurar las iDCs en presencia de los lípidos del polen. Solamente se observa un aumento significativo en la expresión de CD1d al tratar las DCs con LPS en presencia de lípidos del polen. No se aprecian diferencias en la expresión de estos marcadores en las células tratadas con ATRA.



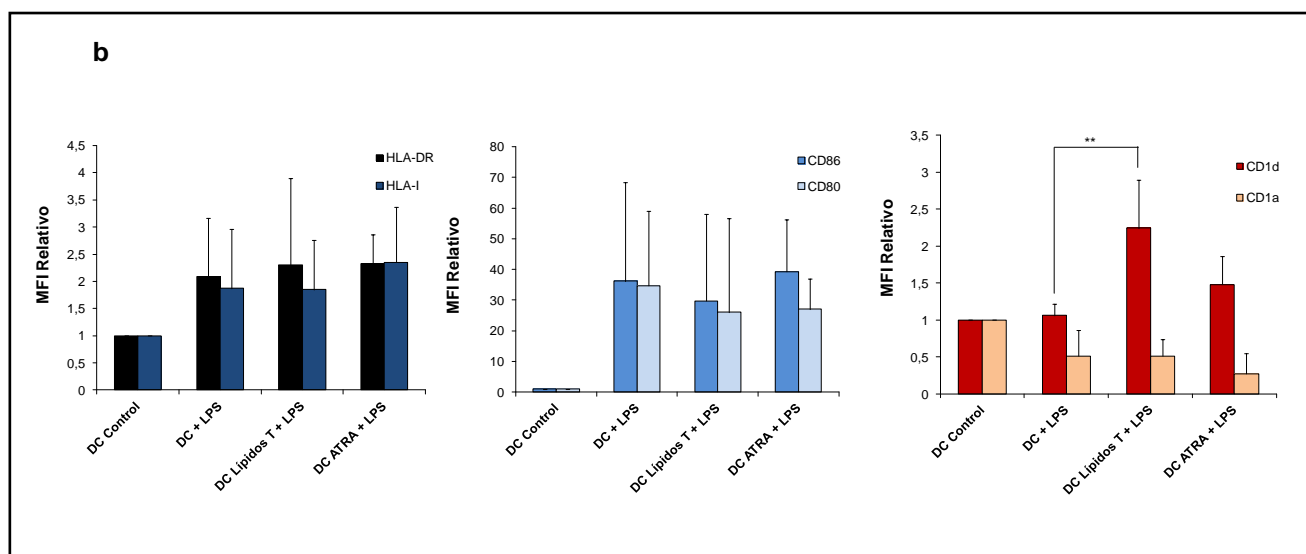


Figura 31. Expresión en superficie de las moléculas HLA-DR, HLA-I, CD86 y CD80 ($n=4$) y CD1d y CD1a ($n=3$) en iDCs control y DCs maduras con LPS en presencia o ausencia de lípidos totales del polen y/o ATRA. a) Experimento representativo. b) MFI relativo \pm S.D. de los distintos marcadores respecto a las células control. Aparecen diferencias significativas (**, $p<0,03$) en la media de fluorescencia de CD1d entre las iDCs tratadas con LPS y las iDCs tratadas con LPS junto con los lípidos totales.

Con el fin de estudiar la influencia de los lípidos del polen de olivo sobre el proceso de diferenciación de monocitos a DCs, éstos fueron añadidos al cultivo junto con las citoquinas (GM-CSF e IL-4) desde el primer día de diferenciación, durante 5 días. La *figura 32* muestra que se mantiene el mismo patrón de expresión de los marcadores analizados en las iDCs tratadas con los lípidos del polen durante 48 h, apreciándose mayores diferencias en la expresión de CD1d y CD1a, es decir, un aumento mayor en la expresión de CD1d y una disminución más marcada de CD1a. En las células tratadas con ATRA también las diferencias son más acusadas respecto al tratamiento estándar sobre iDCs.

Por otro lado, células cultivadas en presencia de la fracción lipídica desde el primer día de diferenciación muestran un mayor incremento en la expresión de CD86 y un aumento significativo de HLA-DR respecto a las células control, que no se observaba al estimular a las iDCs ya diferenciadas. Las células cultivadas en presencia de ATRA sufren también un aumento mayor en la expresión de CD86 y HLA-DR respecto al tratamiento sobre iDCs.

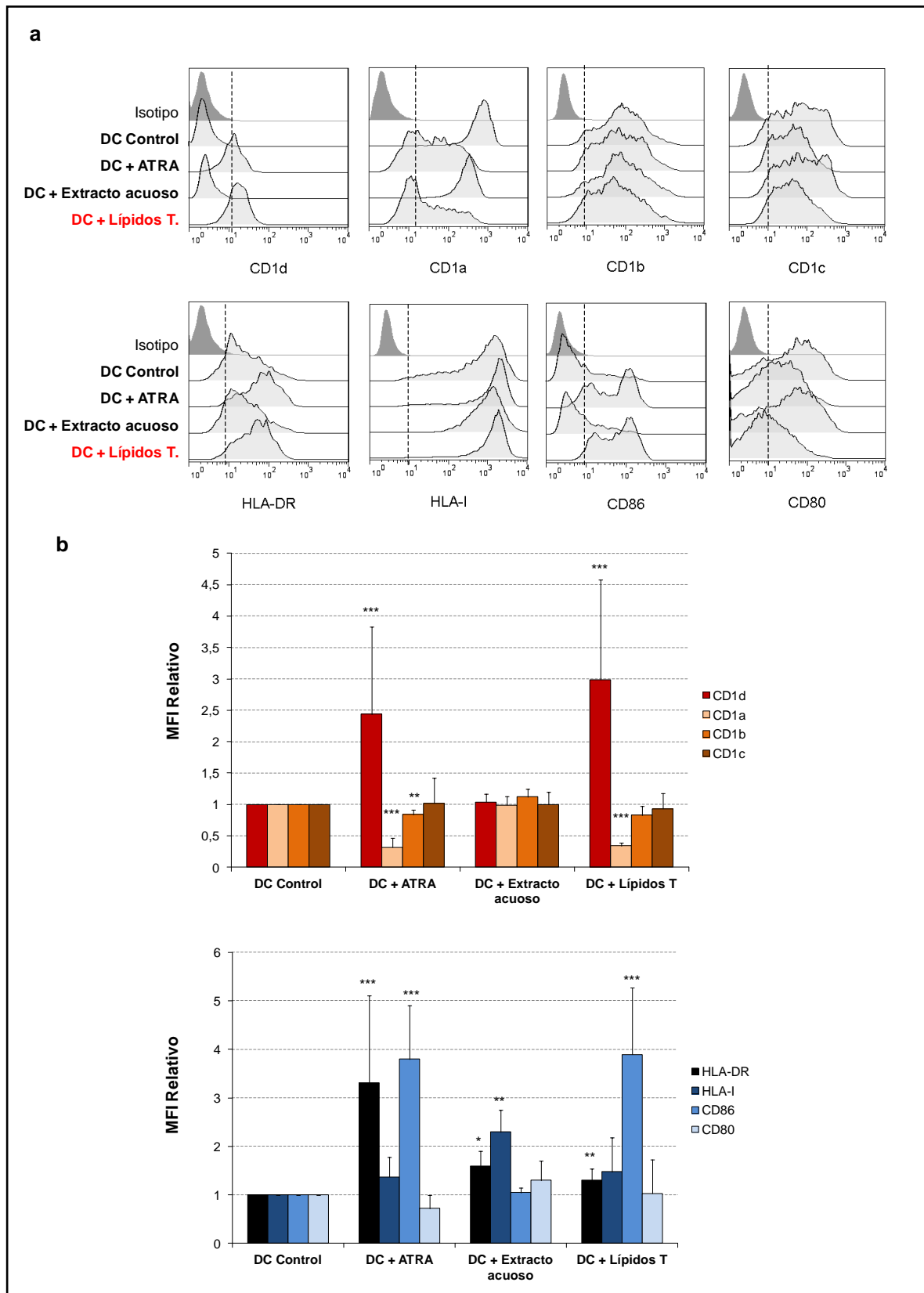


Figura 32. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR, HLA-I, CD86 y CD80 en iDCs estimuladas desde el primer día de diferenciación (durante cinco días) con ATRA, extracto acuoso del polen de olivo y lípidos totales del polen de olivo. a) Experimento representativo. b) MFI relativa \pm S.D. de los distintos marcadores (CD1d, $n=12$; CD1a, $n=8$;

*CD86 y HLA-DR, n=5; CD1b, CD1c, HLA-I y CD80, n=3) en las iDCs tratadas con los estímulos citados anteriormente. Aparecen diferencias significativas en la MFI de CD1d en las DCs tratadas con ATRA y lípidos totales (**, $p<0,01$), CD1a en las DCi estimuladas con ATRA y lípidos totales (**, $p<0,01$), CD1b en las células tratadas con ATRA (**, $p<0,03$), HLA-DR en las células tratadas con LPS (**, $p<0,01$), extracto acuoso del polen (*, $p<0,05$) y lípidos del polen (**, $p<0,03$), HLA-I en las DCs en presencia del extracto acuoso del polen (**, $p<0,03$); y CD86 en las células tratadas con ATRA y lípidos totales del polen (**, $p<0,01$) respecto al control (DC 5d).*

En general, los resultados muestran que la fracción lipídica del polen induce un aumento dosis-dependiente de CD1d en la superficie celular de las iDCs, tanto en las iDCs ya diferenciadas como en las estimuladas desde el primer día de diferenciación. Este incremento se ve acompañado de una disminución en la expresión de CD1a y un aumento en CD86. Además, los lípidos no influyen en la expresión en superficie de las moléculas de maduración en DCs estimuladas con LPS.

3.2. Los lípidos del polen de olivo inducen un aumento de CD1d en macrófagos (M ϕ) derivados de monocitos.

Tras haber observado la acción de los lípidos del polen de olivo sobre iDCs como modelo de células presentadoras por CD1d, se estudió si este efecto se podía trasladar también a otros tipos celulares como los M ϕ . Se utilizaron M ϕ activados por la vía clásica y/o por la vía alternativa como controles internos de activación. Al tratar los M ϕ derivados de monocitos al 5º día de diferenciación durante 48 h con los lípidos procedentes del polen se observa un aumento significativo de la molécula CD1d en la superficie celular (al igual que ocurría con las iDCs) y una tendencia hacia niveles menores de expresión de CD1a (no significativa). Por otro lado, CD1c incrementa su expresión respecto a los M ϕ control ligera pero significativamente y CD1b no sufrió variaciones. De forma análoga a las iDCs también tiene lugar un incremento significativo en la expresión de CD1d en los M ϕ tratados con ATRA. No se producen sin embargo, cambios significativos en la expresión de las moléculas HLA-DR y CD86 ni en las células tratadas con los lípidos ni con ATRA (*Fig. 33*).

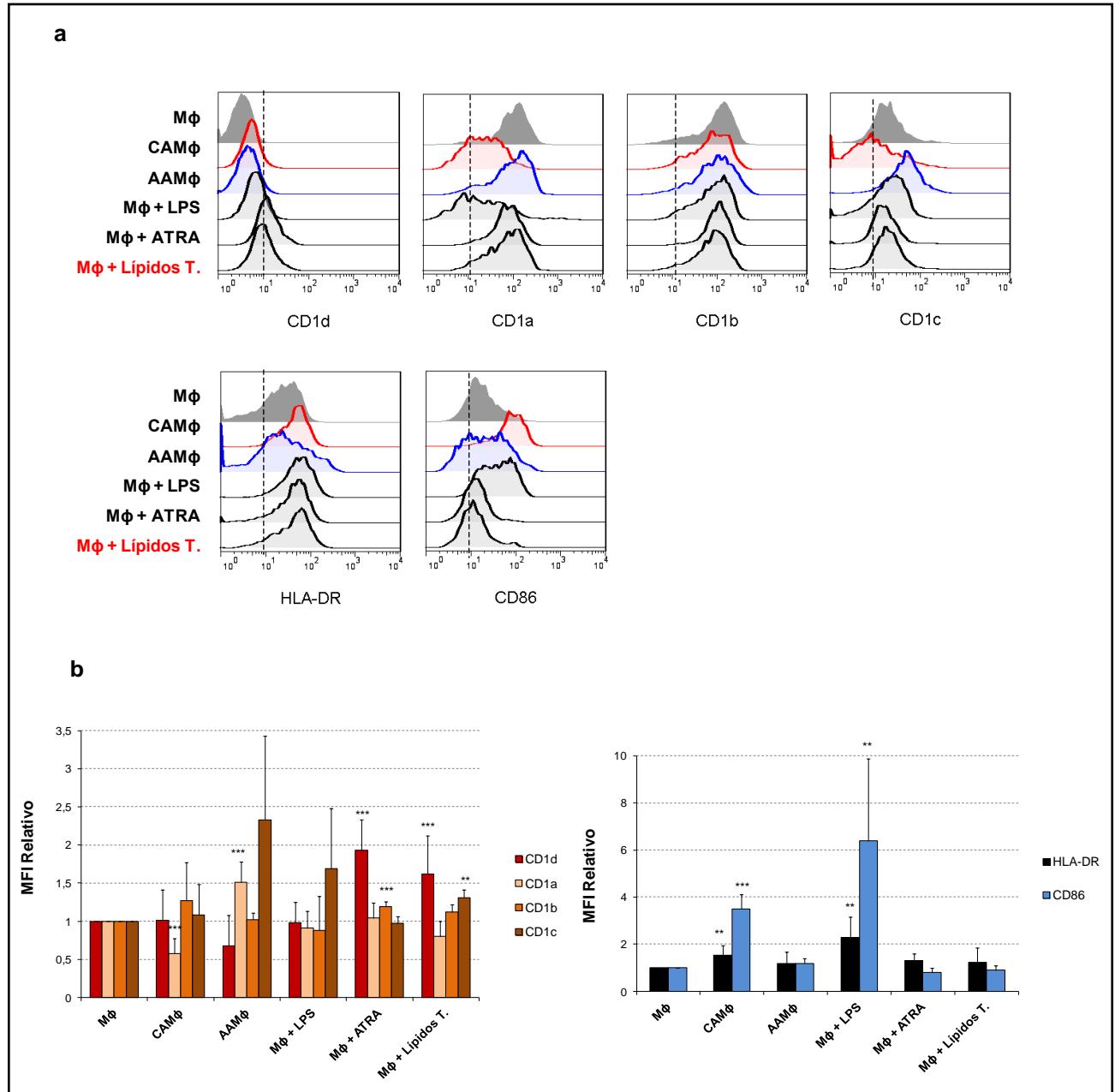
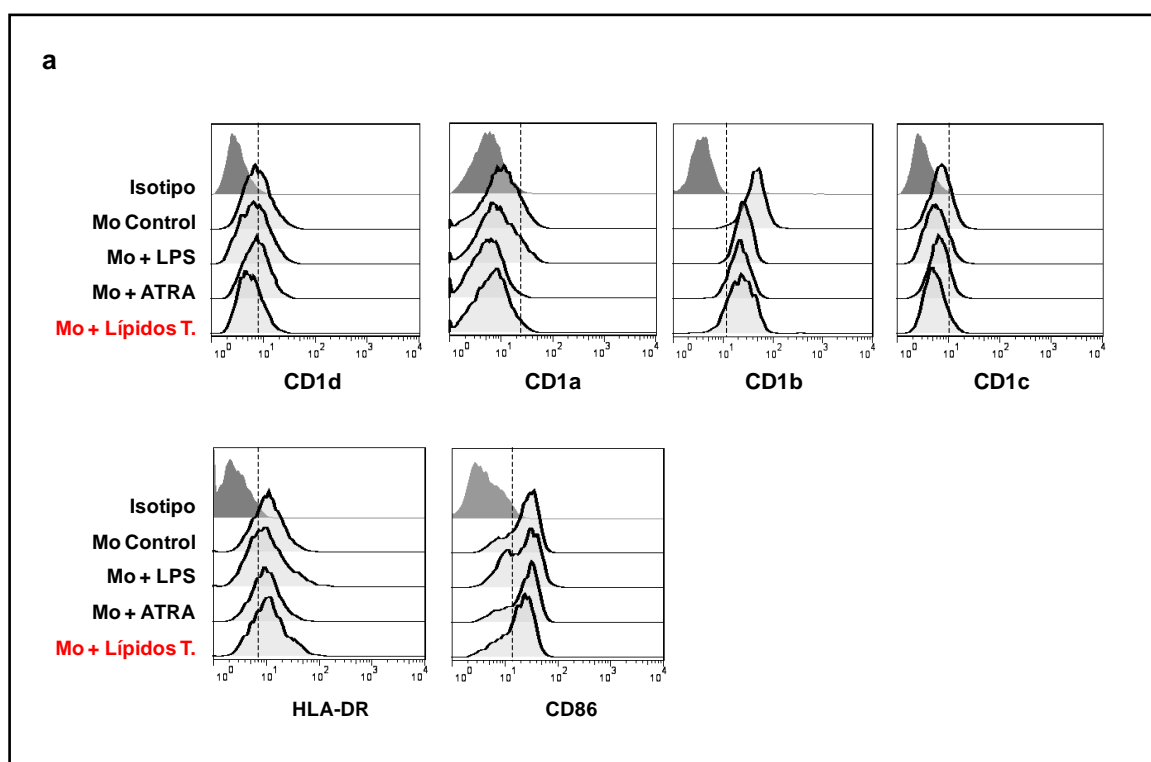


Figura 33. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR y CD86 en Mφ control, activados por la vía clásica (CAMφ), activados por la vía alternativa (AAMφ) y tratados con LPS, ATRA o lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. a) Experimento representativo. b) MFI relativo \pm S.D. de los distintos marcadores (CD1d y CD1a $n=5$; CD1b y CD1c, $n=3$ y CD86 y HLA-DR, $n=4$) en las DCi tratadas con los estímulos citados anteriormente. Aparecen diferencias significativas en la media de fluorescencia de CD1d respecto a las células control en los Mφ tratados con ATRA y lípidos totales (***, $p<0,01$), CD1a en los Mφ activadas por la vía clásica y por la vía alternativa (***, $p<0,01$), CD1b en las células tratadas con ATRA (***, $p<0,01$), CD1c en los Mφ estimulados con lípidos totales del polen (*, $p<0,03$), HLA-DR y CD86 en las células activadas por la vía clásica (HLA-DR: **, $p<0,03$; CD86: ***, $p<0,01$) y tratadas con LPS (**, $p<0,03$).

Podemos decir que los M ϕ , al igual que las iDCs, incrementan la expresión de CD1d en la superficie celular en respuesta a los lípidos totales del polen de olivo.

3.3. Los lípidos del polen de olivo inducen una disminución de las moléculas CD1 del grupo I en monocitos de sangre periférica.

Puesto que las iDCs y los M ϕ utilizados en los experimentos anteriores procedían de monocitos de sangre periférica, se analizó el fenotipo de estas células en respuesta a los lípidos del polen. Al tratar monocitos durante 48 h con los extractos lipídicos del polen se observa una disminución significativa en la expresión de las moléculas CD1 del grupo I respecto a las células control. Hay que considerar que los niveles basales de CD1a y CD1c son muy bajos. Esta disminución en CD1a, -b y -c se observa también en los monocitos cultivados en presencia de ATRA. No obstante, a diferencia de las iDCs y los M ϕ no se produce un aumento significativo en la expresión en la superficie celular de CD1d en los monocitos tratados con lípidos del polen o con ATRA. Los marcadores de maduración HLA-DR y CD86 tampoco experimentaron cambios significativos en su expresión respecto a las células control (*Fig. 34*).



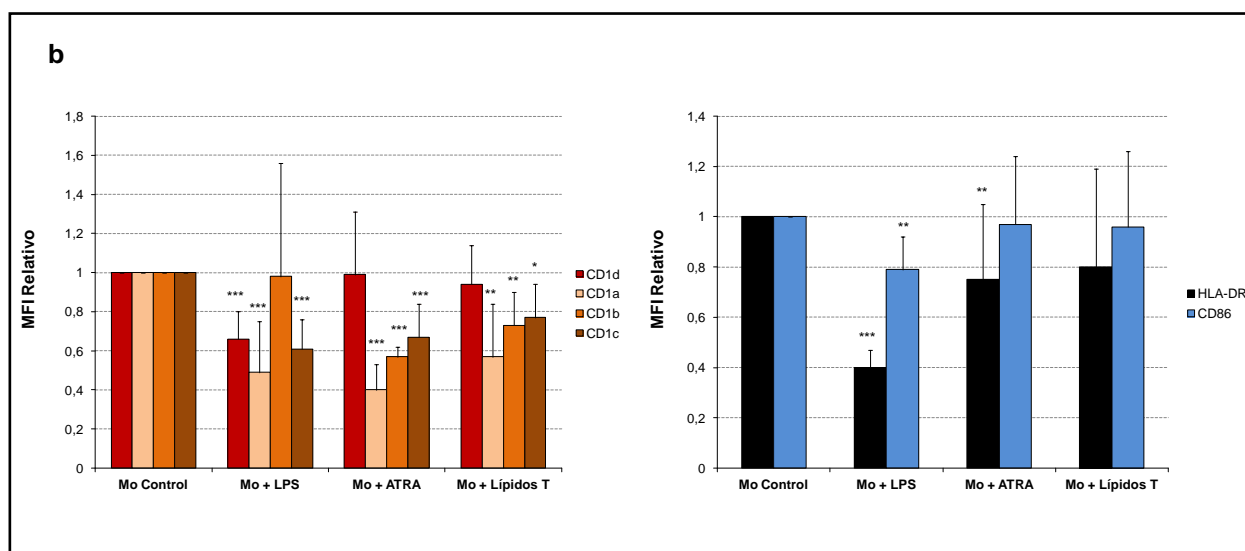


Figura 34. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR y CD86 en monocitos control y tratados con LPS, ATRA o lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. a) Experimento representativo. b) MFI relativo \pm S.D. de los distintos marcadores (CD1d, CD86 y HLA-DR, $n=8$; CD1a, CD1b y CD1c, $n=3$) en los monocitos estimulados. Aparecen diferencias significativas en la media de fluorescencia de CD1d respecto a las células control en los monocitos tratados con LPS (***, $p<0,01$), CD1a en los monocitos tratados con LPS, ATRA (***, $p<0,01$) y lípidos totales (**, $p<0,03$), CD1b en las células estimuladas con ATRA (***, $p<0,01$) y lípidos del polen (***, $p<0,03$), CD1c en los monocitos estimulados con LPS, ATRA (***, $p<0,01$) y lípidos totales del polen (*, $p<0,05$), HLA-DR en las células en presencia de LPS (***, $p<0,01$) y ATRA (**, $p<0,01$) y por último, CD86 en las células tratadas con LPS (**, $p<0,03$).

Por tanto, al contrario del aumento en la superficie celular observado en la expresión de CD1d en iDCs y M ϕ por la fracción lipídica del polen, los monocitos no muestran cambios en su expresión en superficie. Sin embargo, se produce una disminución generalizada en la expresión de CD1a, -b y -c.

3.4. Los extractos lipídicos procedentes del polen del olivo aumentaron la expresión de CD1d en células B.

Para completar el estudio sobre células presentadoras de antígenos que expresan CD1d, se analizó el efecto de los lípidos del polen sobre linfocitos B procedentes de sangre periférica. Recientemente se ha publicado que CD1d y CD1c aumentan su expresión a través de la activación de RAR α en linfocitos B humanos (Allan, Stax et al. 2011). Se cultivaron PBLs (fracción CD14⁻) en presencia o ausencia de lípidos totales durante 48 h. Como se observa en la *figura 35*, los linfocitos B CD19⁺ en estado basal expresan altos niveles de CD1c, pero no expresan CD1a, CD1b ni CD1d. Al tratar los linfocitos con los lípidos del polen se observa un incremento en la

expresión de CD1d⁺ respecto a las células sin tratar, sin cambios en la expresión de las moléculas CD1 del grupo I. Las células estimuladas con ATRA aumentan la expresión de CD1d y CD1c en la superficie celular, confirmando los datos previos.

Los resultados muestran que, al igual que en las iDCs y Mφ, se produce un incremento en la expresión de CD1d en las células B tratadas con lípidos del polen.

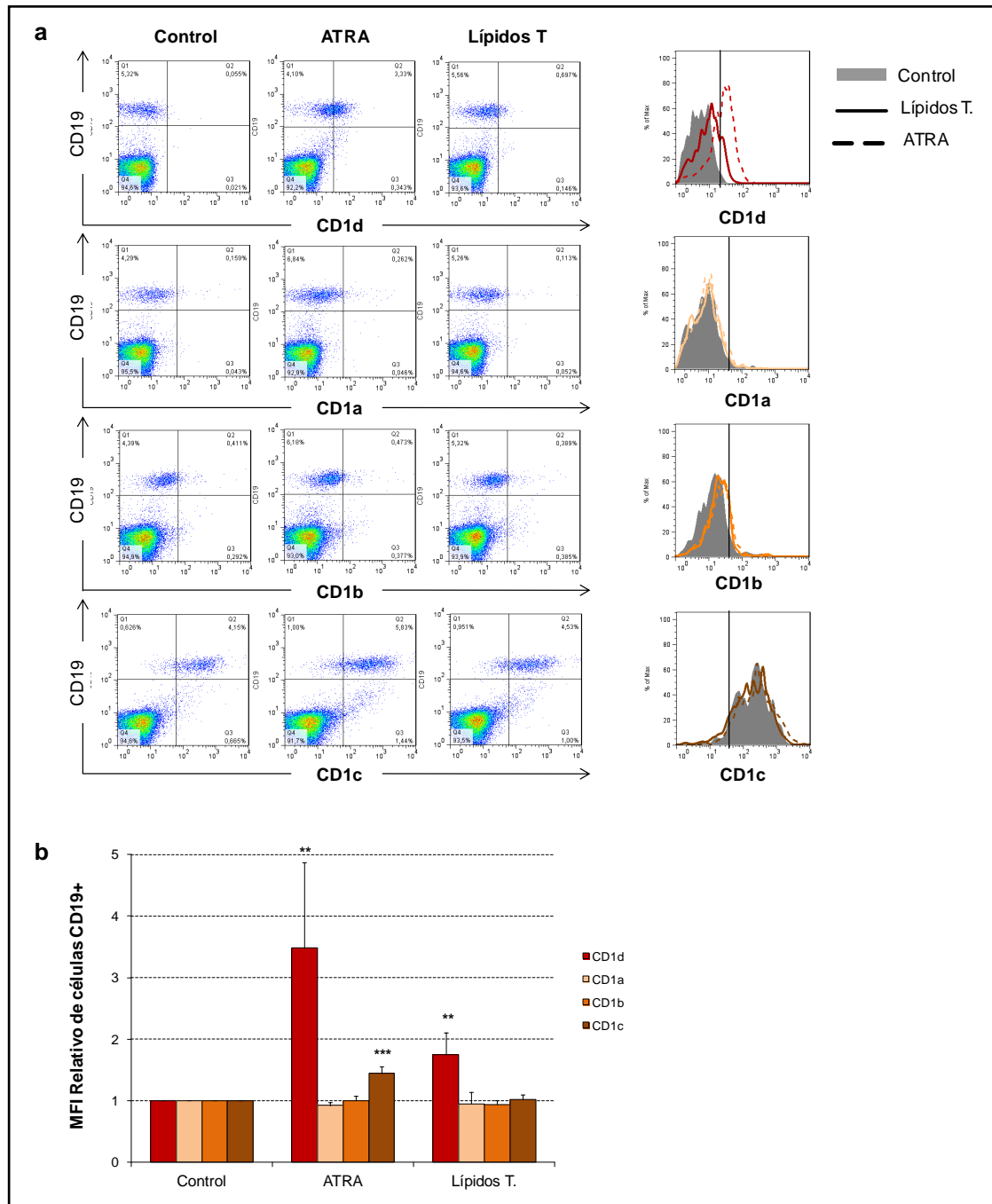
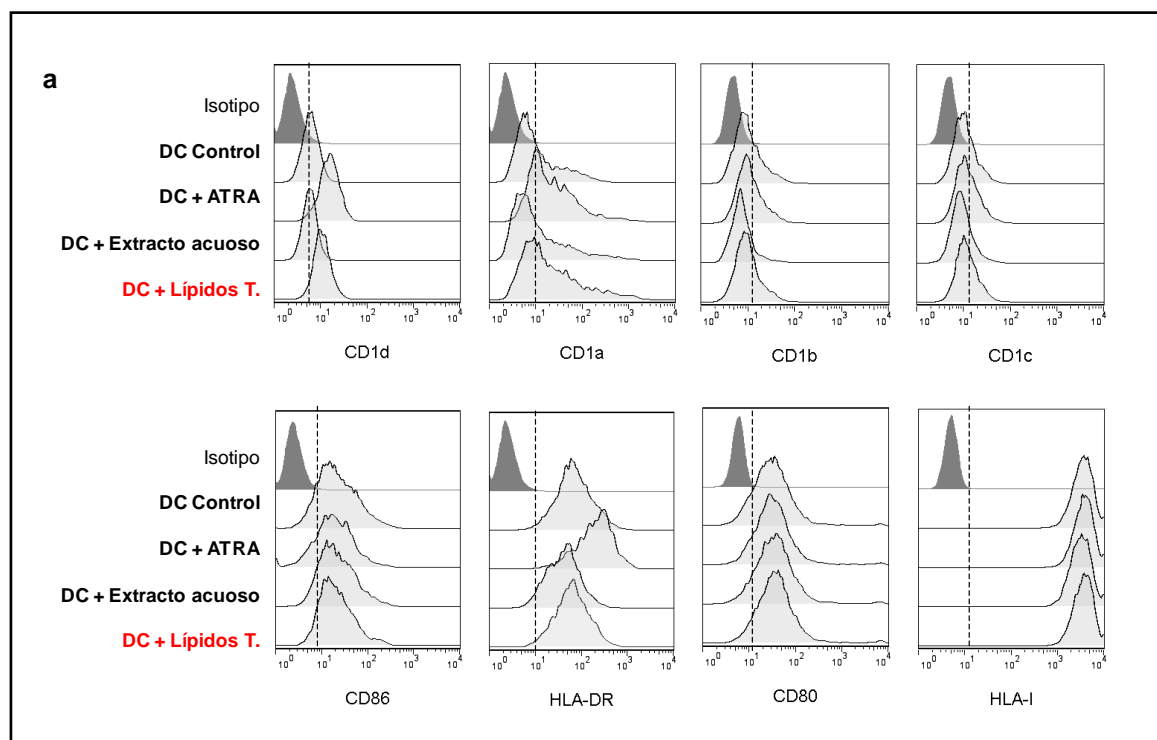


Figura 35. Expresión en superficie de las moléculas CD1 en linfocitos B CD19⁺ de PBLs totales, en condiciones basales y al tratar con ATRA y lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. a) Experimento representativo (porcentaje de células positivas e histogramas).

b) MFI relativa \pm S.D. de las distintas moléculas CD1 ($n=4$). Se observaron diferencias significativas en las células tratadas con ATRA en la expresión de las moléculas CD1d y CD1c y con los lípidos del polen en la expresión de CD1d respecto a las células control (***, $p<0,01$; **, $p<0,03$).

3.5. Las DCs cultivadas en suero humano incrementaron la expresión de CD1d en respuesta a los lípidos del polen.

Los lípidos presentes en el suero ejercen una gran influencia sobre la expresión de las moléculas CD1. De tal modo que el suero humano contiene fosfolípidos (cardiolipina y ácido fosfatídico) que inducen la expresión de altos niveles de CD1d, a la vez que una menor expresión de CD1a, -b y -c en las iDCs a través de la activación del factor de transcripción PPAR γ (al contrario de lo que sucede con el suero de ternera fetal, -FCS-) (Leslie, Dascher et al. 2008). Por ello, analizamos el efecto de los extractos lipídicos procedentes de polen del olivo sobre células cultivadas en suero humano. Al tratar iDCs cultivadas en suero humano con lípidos procedentes del polen se obtiene, al igual que ocurría con las iDCs cultivadas en FCS, un incremento significativo en la expresión de CD1d (*figura 36*). Al contrario que en las células mantenidas con FCS, se observa un leve aumento en la expresión de CD1a respecto a las células control. CD1b y CD1c no sufren cambios significativos.



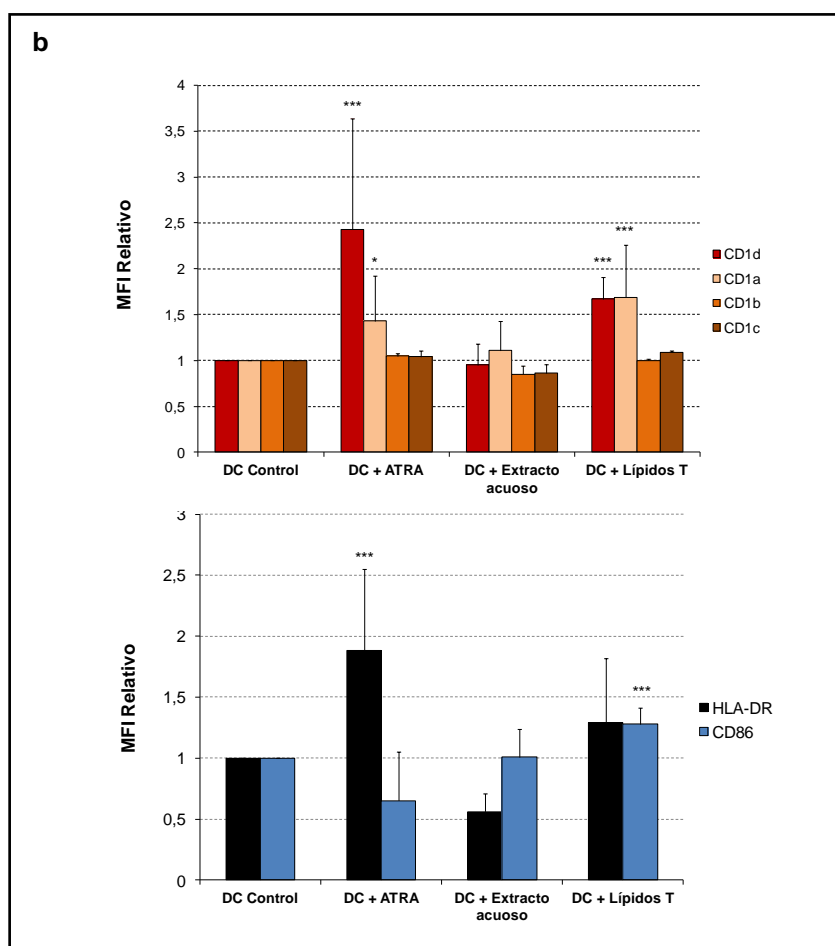


Figura 36. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR, HLA-I, CD86 y CD80 en iDCs cultivadas en medio de cultivo con suero humano AB, durante 48 h en presencia o ausencia de ATRA, extracto acuoso del polen de olivo y lípidos totales del polen. a) Experimento representativo. b) MFI relativa \pm S.D. de los distintos marcadores (CD1d, $n=8$; CD1a, $n=7$; CD1b, CD1c, CD86 y HLA-DR, $n=3$) en iDCs tratadas con los estímulos citados anteriormente. Existen diferencias significativas en la MFI de CD1d en las DCs tratadas con ATRA y lípidos totales (***, $p<0,01$), CD1a en las DCi estimuladas con ATRA (*, $p<0,05$) y lípidos totales (***, $p<0,01$), HLA-DR en las células tratadas con ATRA (***, $p<0,01$) y CD86 en las células tratadas con lípidos totales del polen (***, $p<0,01$).

En cuanto a las moléculas de maduración el aumento de CD86 es menor que en las iDCs cultivadas en FCS pero estadísticamente significativo y no se observan cambios en la expresión de HLA-DR, CD80 ni HLA-I.

Los M ϕ cultivados en suero humano no expresan CD1d, -a ni -b en la superficie celular y, sólo muestran una expresión moderada de CD1c, menor que al ser cultivados en FCS. Los lípidos del polen no originan cambios en la expresión de ninguna de las moléculas CD1, HLA-DR ni CD86 respecto a las células control (figura 37).

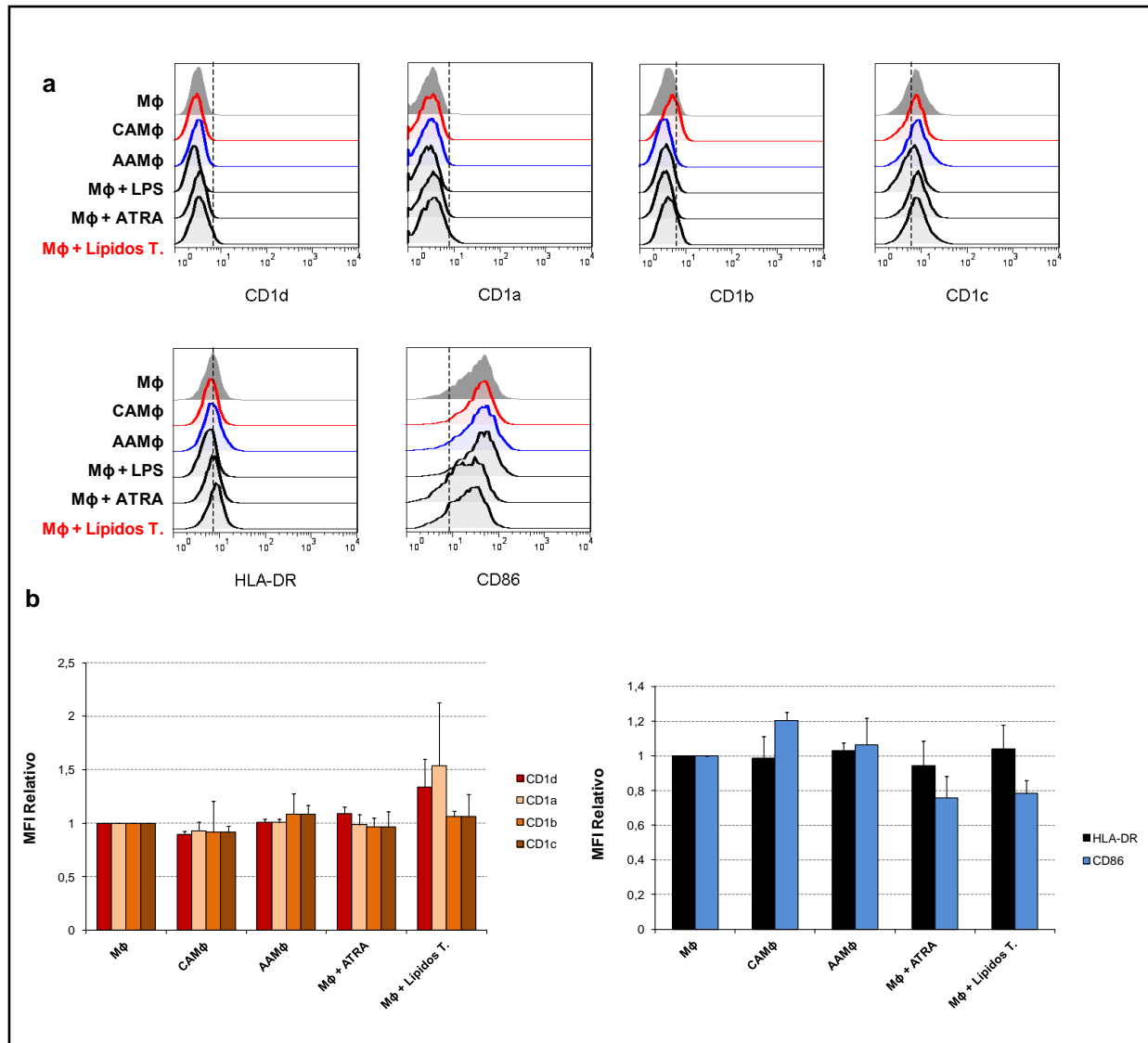


Figura 37. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR y CD86 cultivadas en Mφ control, activados por la vía clásica (CAMφ), activados por la vía alternativa (AAMφ) y tratados con LPS, ATRA o lípidos totales del polen de olivo (48 h) en medio con suero humano AB. a) Experimento representativo. b) MFI relativa \pm S.D. de los distintos marcadores ($n=3$) en los Mφ estimulados respecto a las células control.

Los monocitos tratados con lípidos del polen durante 48 h en medio con suero humano, aumentan la expresión de CD1d y CD1c ligera, pero significativamente. Por el contrario, los lípidos inducen una disminución en CD1a (Ver Fig. 38).

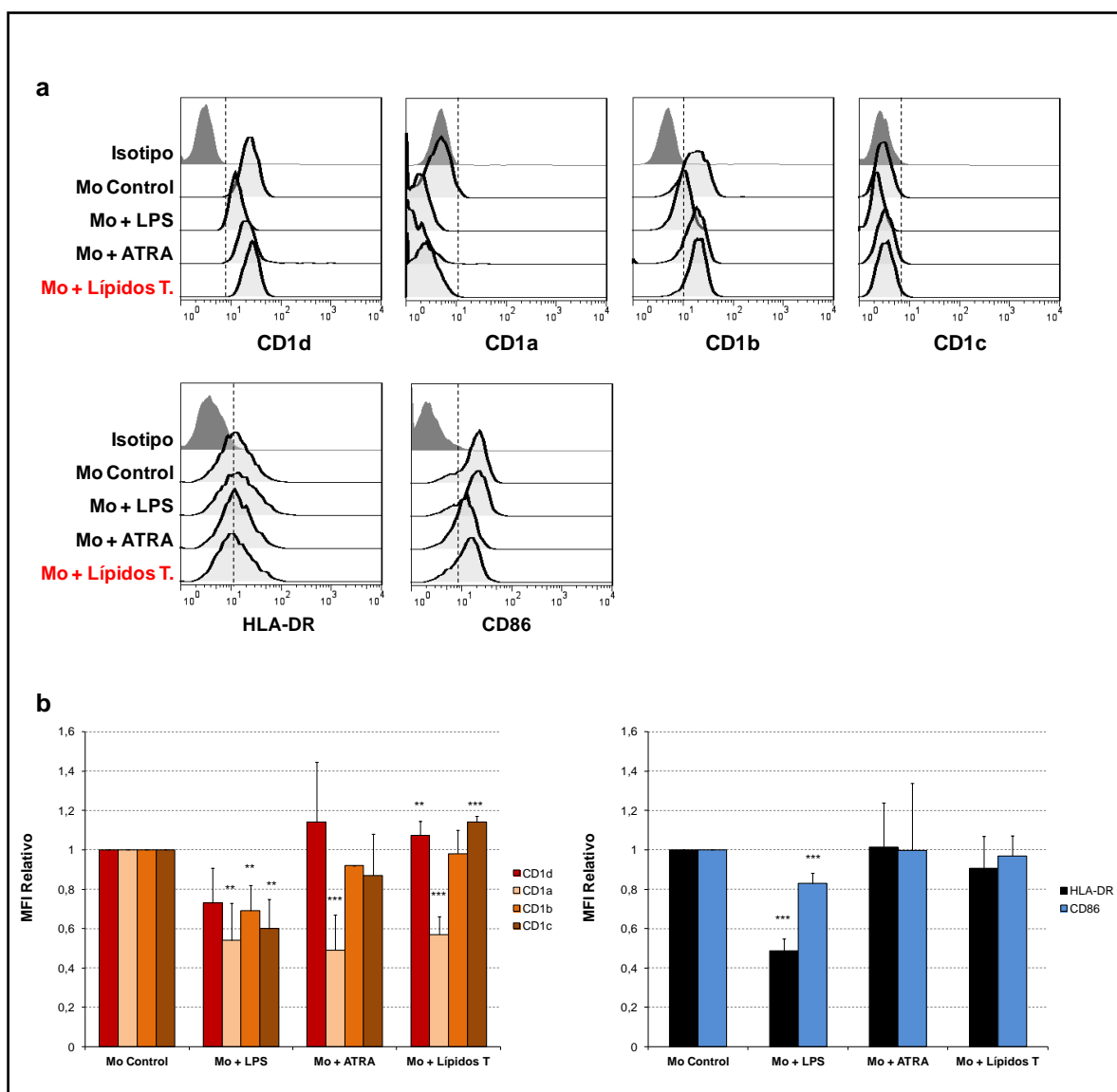


Figura 38. Expresión en superficie de las moléculas CD1, HLA-DR y CD86 en monocitos control y tratados con LPS, ATRA o lípidos totales del polen de olivo en medio con suero humano AB durante 48 h. a) Experimento representativo. b) MFI relativa \pm S.D. de los distintos marcadores (CD1d, CD86 y HLA-DR, $n=6$; CD1a, CD1b y CD1c, $n=3$) en los monocitos tratados con los estímulos respecto a las células sin tratar. Aparecen diferencias significativas en la media de fluorescencia de CD1d en los monocitos tratados con lípidos totales del polen (**, $p<0,03$), CD1a en los monocitos tratados con LPS (**, $p<0,03$), ATRA y lípidos totales del polen (***, $p<0,01$), CD1b en las células estimuladas con LPS (**, $p<0,03$), CD1c en los monocitos cultivados en presencia de LPS (**, $p<0,03$) y lípidos del polen (***, $p<0,01$). HLA-DR y CD86 disminuyen en presencia de LPS (***, $p<0,01$).

Por último, los linfocitos B cultivados en suero humano y tratados con lípidos del polen de olivo muestran un aumento en la expresión de CD1d respecto a las células control, sin cambios en las moléculas CD1 del grupo I (Fig. 39).

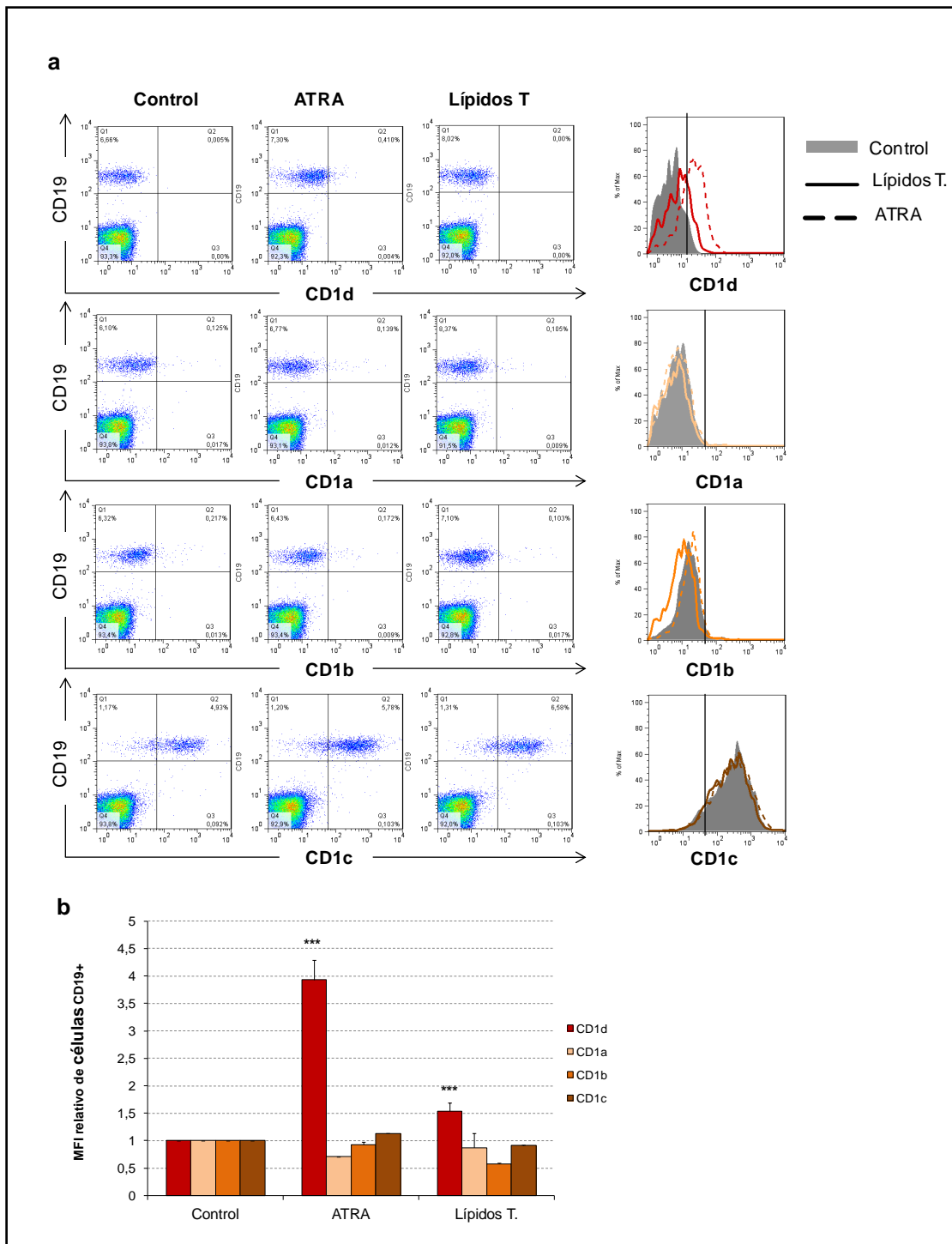
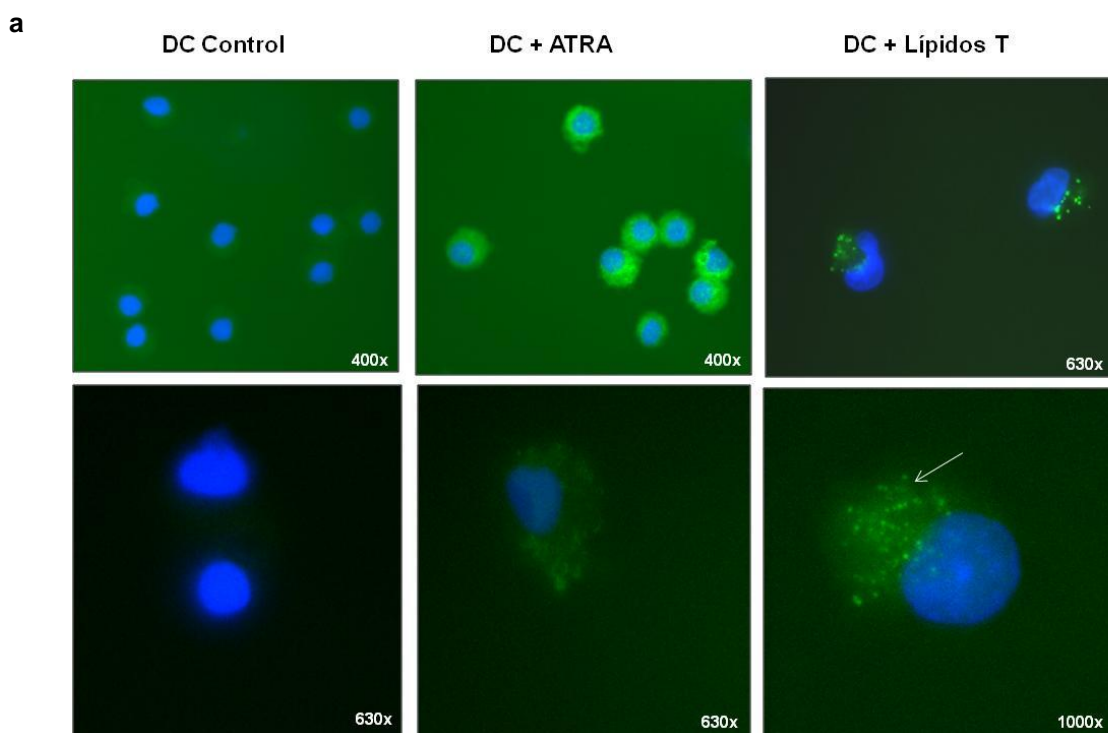


Figura 39. Expresión en superficie de las moléculas CD1 en linfocitos B CD19⁺ en PBLs cultivados en medio con suero humano, en condiciones basales y tras el tratamiento con ATRA y lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. a) Experimento representativo (porcentaje de células positivas e histogramas). b) MFI relativo \pm S.D. de las células estimuladas respecto a las células control ($n=2$).

Los resultados muestran que los lípidos del polen mantienen el incremento de CD1d en iDCs cultivadas en suero humano y además, a diferencia de las células cultivadas en FCS, inducen un aumento en la expresión de CD1a en la superficie celular, a niveles bajos pero significativos. Los M ϕ no sufren cambios respecto a las células sin tratar, y monocitos y linfocitos B incrementan CD1d ligera pero significativamente.

4. Los lípidos del polen de olivo inducen síntesis *de novo* de CD1d en DCs.

El aumento de expresión de CD1d en la superficie celular inducido por los lípidos del polen puede deberse a un incremento de la proteína o a una traslocación de la misma del interior celular hacia la superficie. Para examinar estas posibilidades analizamos la distribución celular de CD1d en las iDCs tratadas con los lípidos del polen mediante microscopía de fluorescencia. Tanto en las iDCs tratadas con ATRA como en las iDCs tratadas con lípidos totales se advierte un aumento de CD1d respecto a las células control y que la proteína se localiza en membrana e intracelularmente en vesículas de secreción (*Fig 40a*). Además, el análisis de CD1d intracelular por citometría de flujo confirma este aumento de proteína total respecto a las iDCs control (*Fig 40b*).



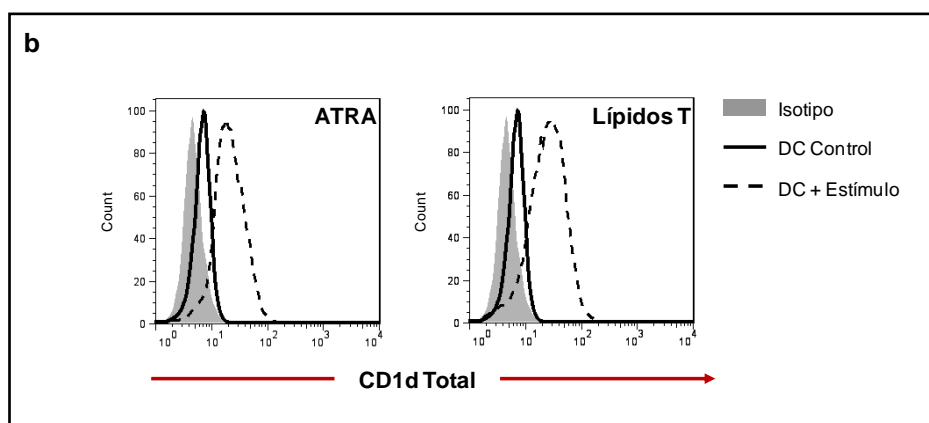


Figura 40. Expresión de CD1d en iDCs tratadas y sin tratar con ATRA o lípidos totales del polen de olivo. a) Células observadas al microscopio de fluorescencia. Núcleos teñidos con DAPI (azul), CD1d teñido con anti-human CD1d y Alexa Flúor 488 (verde). b) Expresión intracelular por citometría de flujo.

Este resultado indica que el aumento en la expresión en superficie de CD1d es generado por un incremento en la proteína y no por cambios en la distribución intracelular de la molécula

4.1. Los lípidos totales del polen de olivo aumentan la expresión de CD1d a nivel transcripcional.

Los cambios en la expresión proteica de las moléculas CD1 inducidos por los lípidos del polen podían estar asociados a modificaciones a nivel transcripcional. Para comprobar esta hipótesis se realizó PCR cuantitativa a tiempo real de las moléculas CD1 en las células tratadas y sin tratar con los lípidos del polen.

Los resultados muestran que el patrón de expresión génica de CD1a y CD1d obtenido en las iDCs tratadas con los lípidos del polen de olivo se correlaciona con su expresión en superficie. Es decir, los lípidos del polen aumentan la expresión del gen de CD1d al mismo tiempo que disminuyen la expresión génica de las moléculas CD1 del grupo I (CD1a, -b y -c) respecto a las iDCs sin tratar (*Fig 41*). Por lo tanto, los lípidos del polen ejercen el mismo efecto que el ATRA sobre los genes CD1.

Por otro lado, observamos que en las DCs maduras en presencia de LPS disminuye de forma muy acusada la expresión génica de CD1a, -b y -c, sin producir cambios significativos en la expresión de CD1d.

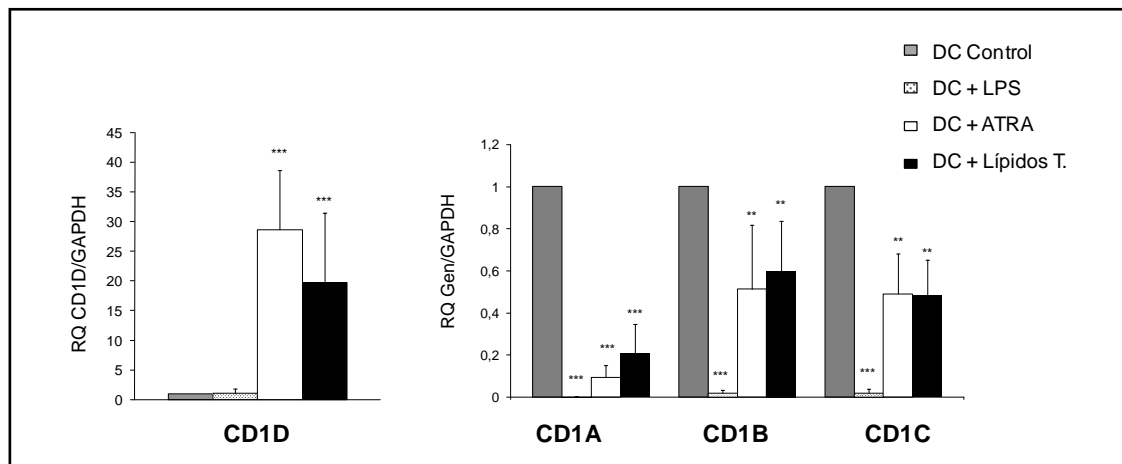


Figura 41. Expresión génica relativa de CD1d, CD1a, CD1b y CD1c en DCi tratadas con LPS, ATRA o lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. Los niveles de RNAm fueron medidos por q-PCR a tiempo real y normalizados a la expresión de GAPDH. Los datos representan la media \pm S.D. de la expresión génica para las moléculas CD1d ($n=8$), CD1a ($n=6$) y CD1b y CD1c ($n=4$). Los resultados mostraron un aumento significativo de CD1d en las DCi tratadas con ATRA y con los lípidos totales del polen (***, $p<0,01$), así como una disminución significativa en la expresión de CD1a, -b y -c en las células estimuladas con LPS, ATRA y lípidos totales del polen (***, $p<0,01$; **, $p<0,03$) respecto a las células control.

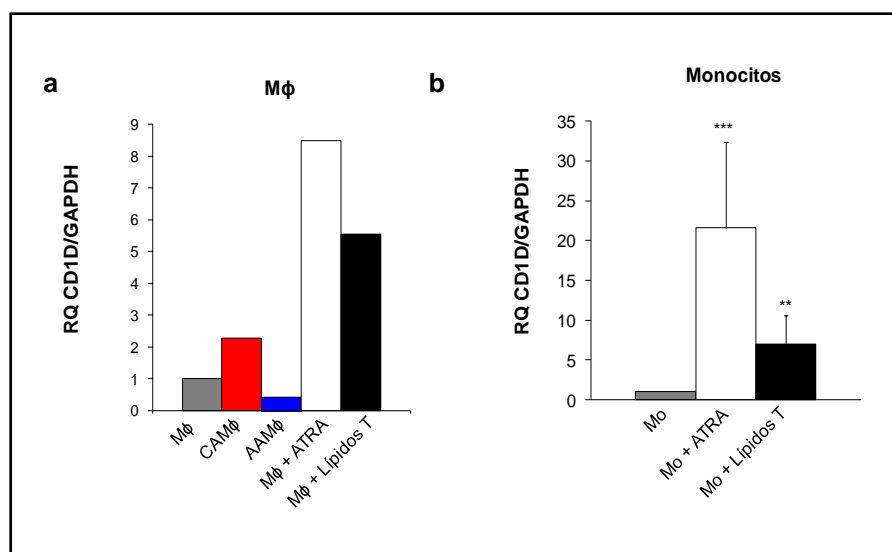


Figura 42. a) Experimento representativo ($n=2$) de la expresión génica relativa de CD1d en Mφ activados por la vía clásica, por la vía alternativa y tratados con ATRA o lípidos totales del polen durante 48 h. Los niveles de RNAm se midieron por q-PCR a tiempo real y los valores se normalizaron respecto a GAPDH. b) Expresión génica relativa de CD1d en monocitos tratados con ATRA o lípidos totales del polen durante 48 h. Los datos representan la media \pm S.D. de la expresión génica de CD1d ($n=3$). Se observa un aumento significativo tanto en los monocitos tratados con ATRA (***, $p<0,01$) como en los monocitos estimulados con los lípidos de polen (**, $p<0,03$).

Se analizó también la regulación transcripcional de las moléculas CD1 en $M\phi$ y en monocitos tratados con los extractos lipídicos del polen, observándose, al igual que en las iDCs, un aumento en los niveles de RNAm de CD1d en ambos tipos celulares (Fig 42). Este aumento génico de CD1d se correlaciona con el incremento de la proteína en la superficie celular en el caso de los $M\phi$, pero no coincide con el patrón de expresión observado en monocitos.

Los resultados de este apartado muestran que la fracción lipídica del polen induce un aumento transcripcional de CD1d en los tres tipos celulares analizados: iDCs, $M\phi$ y monocitos.

4.2. El aumento en la expresión génica de CD1d inducido por los lípidos del polen de olivo es dependiente de la activación del factor de transcripción PPAR- γ .

Después de observar el aumento transcripcional producido por los lípidos del polen sobre CD1d, analizamos si este incremento era dependiente de la activación del factor de transcripción activado por lípidos, PPAR γ . Se ha descrito que la estimulación de PPAR γ activa la síntesis de ácido retinoico mediante la inducción de las enzimas que metabolizan ATRA intracelular a partir de retinol (Szatmari, Pap et al. 2006). Por otro lado, como ya se había mencionado anteriormente, el ATRA aumenta la expresión génica de CD1d por la vía del receptor de ácido retinoico (RAR α) al mismo tiempo que disminuye la transcripción de CD1a.

Al tratar las iDCs con agonistas de PPAR γ como la rosiglitazona (RSG), compuesto de la familia de las tiazolidinedionas (drogas utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II por mejorar la sensibilidad a la insulina), se incrementan los niveles de expresión de CD1d, a la vez que disminuyen los de CD1a. Está descrito que PPAR γ puede ser activado también por ácidos grasos mono- y poliinsaturados, como el ácido linoleico, linolénico y el ácido araquidónico (Kliwer, Sundseth et al. 1997). Puesto que el polen de olivo es muy rico en ácidos grasos insaturados éste podía constituir una fuente de ligandos que activaran PPAR γ y que produjeran el aumento observado en la expresión de CD1d.

Para comprobar si la modulación en la expresión de las moléculas CD1 en presencia de los lípidos del polen era dependiente de la activación de PPAR γ se utilizó GW9662, antagonista selectivo e irreversible de PPAR γ . Las iDCs fueron tratadas con los lípidos del polen durante 5 días en presencia y ausencia del inhibidor GW9662, desde el primer día de diferenciación. Seguidamente, se analizó la expresión de CD1d y CD1a, utilizando RSG como control positivo de activación de PPAR γ . Como se muestra en la *Figura 43*, el inhibidor de PPAR γ impide el aumento de CD1d inducido por los lípidos del polen de olivo a nivel transcripcional, manteniendo la expresión génica de CD1d al nivel de las iDCs sin estimular. Del mismo modo, el aumento génico de CD1d producido por la RSG también es inhibido por el antagonista de PPAR γ , como era lo esperado. Efectivamente se confirma que el aumento transcripcional de CD1d provocado por los lípidos del polen está causado por la activación de PPAR γ .

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurría con las células tratadas con RSG, el antagonista de PPAR γ sólo pudo restaurar parcialmente los niveles de expresión génica de CD1a en las células tratadas con los lípidos del polen.

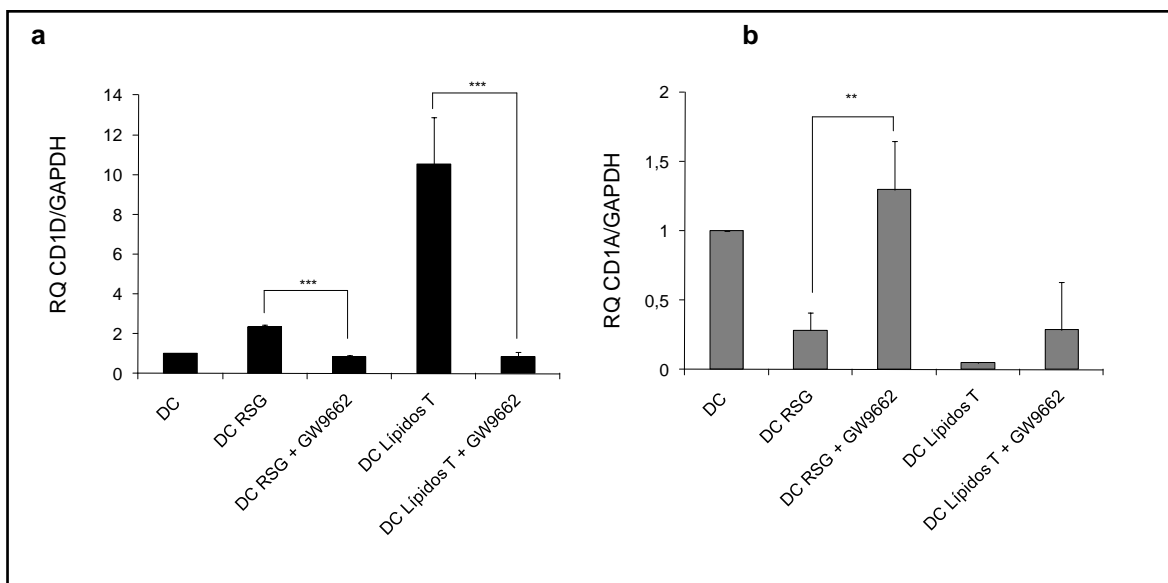


Figura 43. Efecto del antagonista de PPAR- γ (GW9662) en la expresión génica relativa de CD1d (a) y CD1a (b) en iDCs tratadas con lípidos totales del polen de olivo desde el primer día de diferenciación, durante 5 días. Los niveles de RNAm se midieron por q-PCR a tiempo real y los valores se normalizaron respecto a GAPDH. Las células tratadas con RSG en presencia o ausencia de GW9662 fueron usadas como control. Los datos representan la media \pm S.D. de la expresión génica de CD1d y CD1a ($n=4$), observándose diferencias significativas en la expresión de CD1d entre las iDCs tratadas con los lípidos con y sin el antagonista de PPAR- γ (***, $p<0,01$).

En paralelo, se estudió el efecto del inhibidor de PPAR γ en DCs maduras durante 48 h con LPS en presencia o ausencia de GW9662. Como se puede observar en la *Figura 44*, no se observa ninguna variación en la expresión génica de ninguna de las moléculas CD1 al tratar las células con LPS, con o sin el antagonista de PPAR γ .

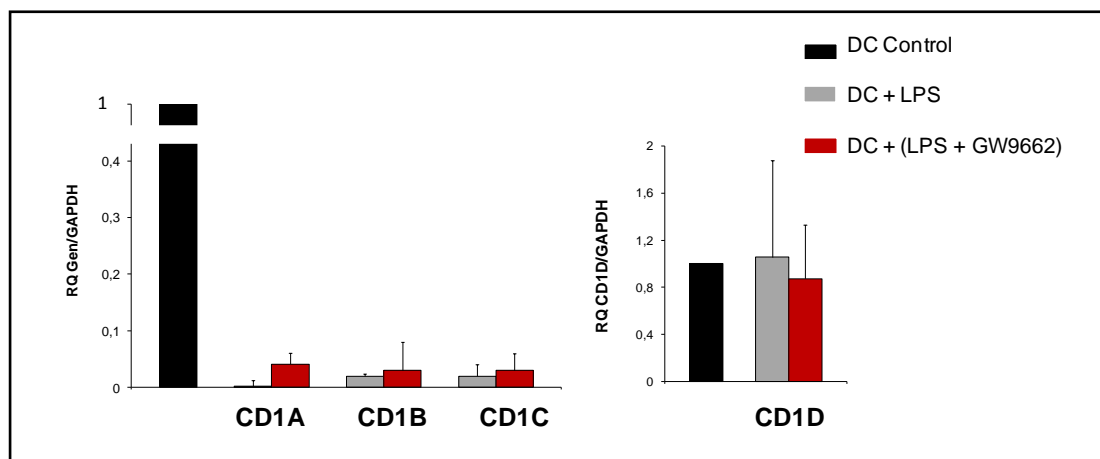


Figura 44. Efecto del antagonista de PPAR- γ (GW9662) en la expresión génica relativa de las moléculas CD1 en las iDCs tratadas con LPS durante 48 horas. Los niveles de RNAm se midieron por q-PCR a tiempo real y los valores se normalizaron respecto a GAPDH. Los datos representan la media \pm S.D. de la expresión génica de CD1a, CD1b, CD1c y CD1d de tres experimentos realizados.

Respecto al patrón de expresión de CD1d en la superficie celular en presencia del antagonista de PPAR γ se observa una inhibición sólo parcial de la proteína (*Fig 45*), al contrario de lo que ocurre a nivel transcripcional, donde la inhibición es total. Por otra parte, la molécula CD1a no es restaurada completamente en la superficie, lo cual se corresponde con los resultados a nivel génico. Las iDCs tratadas con ATRA junto con el inhibidor de PPAR γ experimentan incluso un incremento de CD1d en superficie respecto a las iDCs tratadas solamente con ATRA, verificando el hecho de que el aumento transcripcional de CD1d producido por el ATRA es posterior a la activación de PPAR γ .

También estudiamos la influencia del antagonista de PPAR γ sobre los marcadores de maduración de iDCs (HLA-DR y CD86) en células tratadas con RSG o lípidos totales del polen desde el primer día de diferenciación. Efectivamente, al tratar las iDCs con el inhibidor de PPAR γ el aumento en CD86 producido por la RSG es totalmente abolido. Sin embargo, sólo se da una inhibición parcial en el caso de las iDCs tratadas con lípidos del polen, sugiriendo que otros factores independientes a la activación de PPAR γ intervienen en el aumento de CD86 producido por los lípidos

totales. Las moléculas de clase II no sufren variaciones significativas ni en el caso de la RSG ni de los lípidos del polen de olivo (Fig 46).

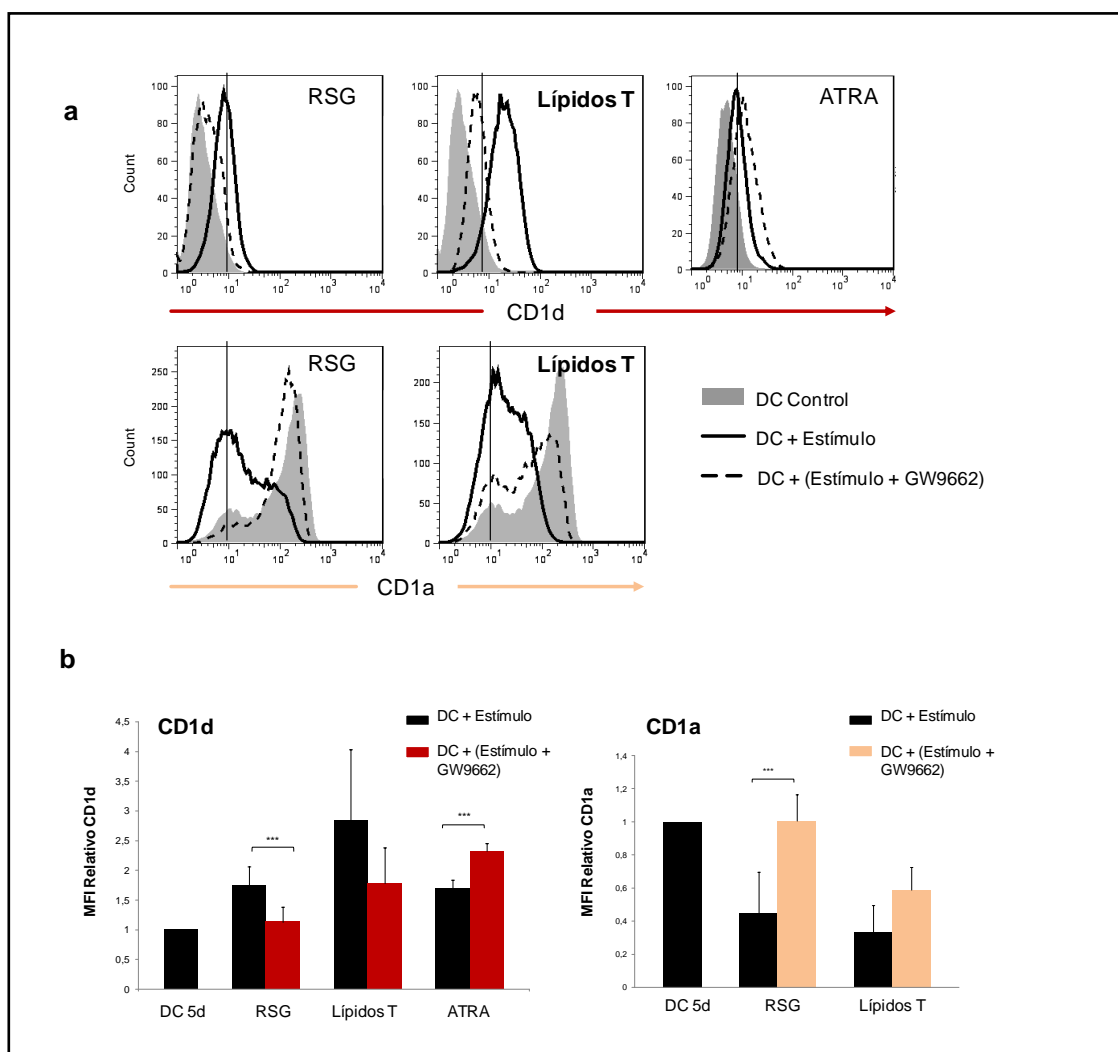


Figura 45. Expresión en superficie de las moléculas CD1d (n=6) y CD1a (n=3) en las iDCs tratadas con RSG, lípidos del polen de olivo y ATRA, en presencia y/o ausencia del antagonista de PPAR- γ durante 5 días, desde el primer día de diferenciación. a) Experimento representativo. b) MFI relativo \pm S.D. de CD1d (n=6) y CD1a (n=3) entre las iDCs tratadas con cada uno de los estímulos anteriormente citados con y sin GW9662. Se observaron diferencias significativas para CD1d entre las células tratadas con ATRA con y sin el antagonista de PPAR γ (***, $p < 0,01$), y en CD1a en las iDCs con RSG, en presencia y ausencia de GW9662 (***, $p < 0,01$).

Los resultados de inhibición de PPAR γ en iDCs ya diferenciadas muestran un comportamiento similar a las células estimuladas desde el primer día de diferenciación en la expresión génica de CD1d y CD1a; es decir, CD1d disminuye hasta valores cercanos al control en las iDCs tratadas con los lípidos del polen en presencia del

antagonista de PPAR γ . Por el contrario y al igual que anteriormente, CD1a no recupera totalmente los niveles transcripcionales (*Fig. 47a*).

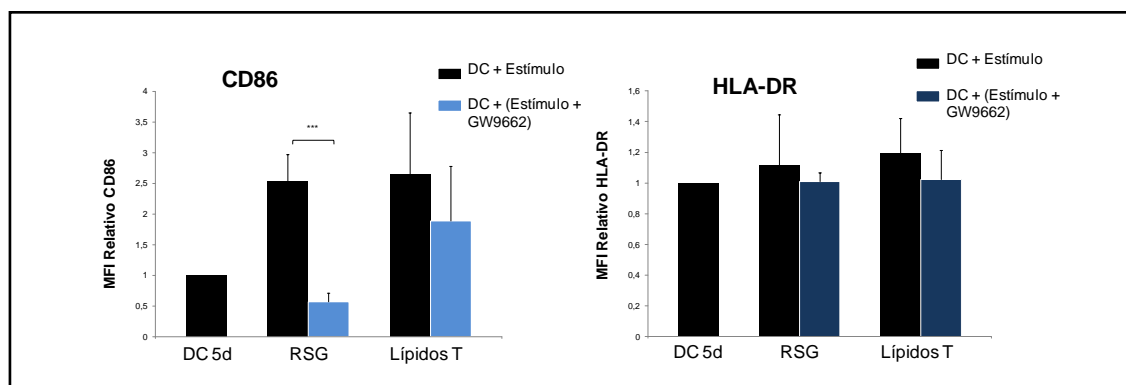
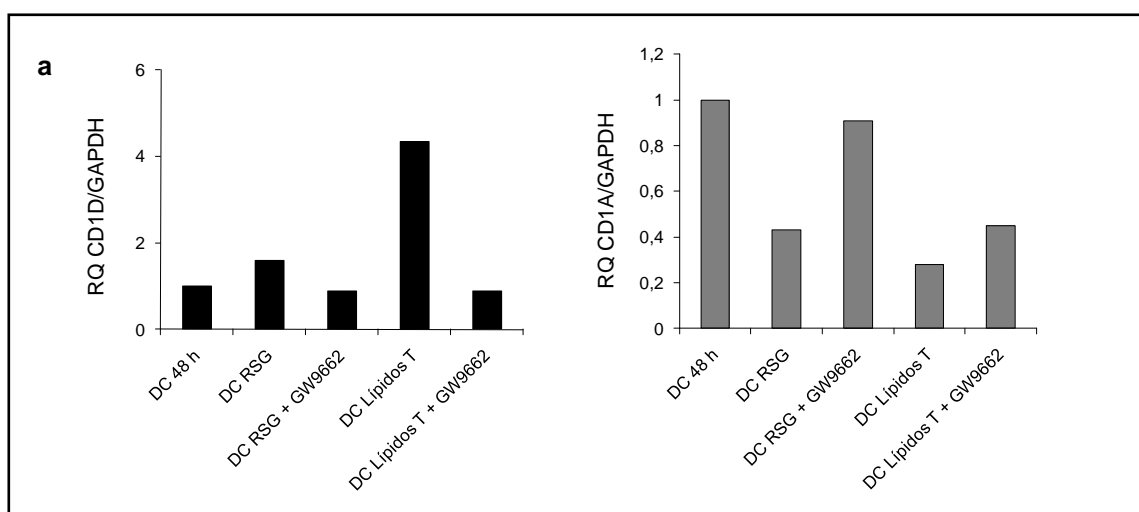


Figura 46. Expresión en superficie de las moléculas HLA-DR y CD86 ($n=3$) en las iDCs tratadas con RSG y lípidos del polen de olivo, en presencia y/o ausencia del antagonista de PPAR γ durante 5 días, desde el primer día de diferenciación. MFI relativo \pm S.D. de HLA-DR y CD86 ($n=3$) entre las iDCs tratadas con cada uno de los estímulos anteriormente citados con y sin GW9662. Aparecieron diferencias significativas para CD86 entre las células con RSG tratadas y sin tratar con el antagonista de PPAR- γ (***, $p<0,01$).

Respecto a la expresión en la superficie celular, las moléculas CD1d, CD1a, CD86 y HLA-DR siguen el mismo patrón que al estimular las células desde el primer día de diferenciación, con una inhibición parcial de CD1d, CD1a y CD86; y sin cambios en HLA-DR (*Fig. 47b*).

En general, los resultados muestran que el aumento génico de CD1d inducido por la fracción lipídica del polen es dependiente de la activación de PPAR γ , tanto en las iDCs ya diferenciadas como en las estimuladas desde el primer día de diferenciación.



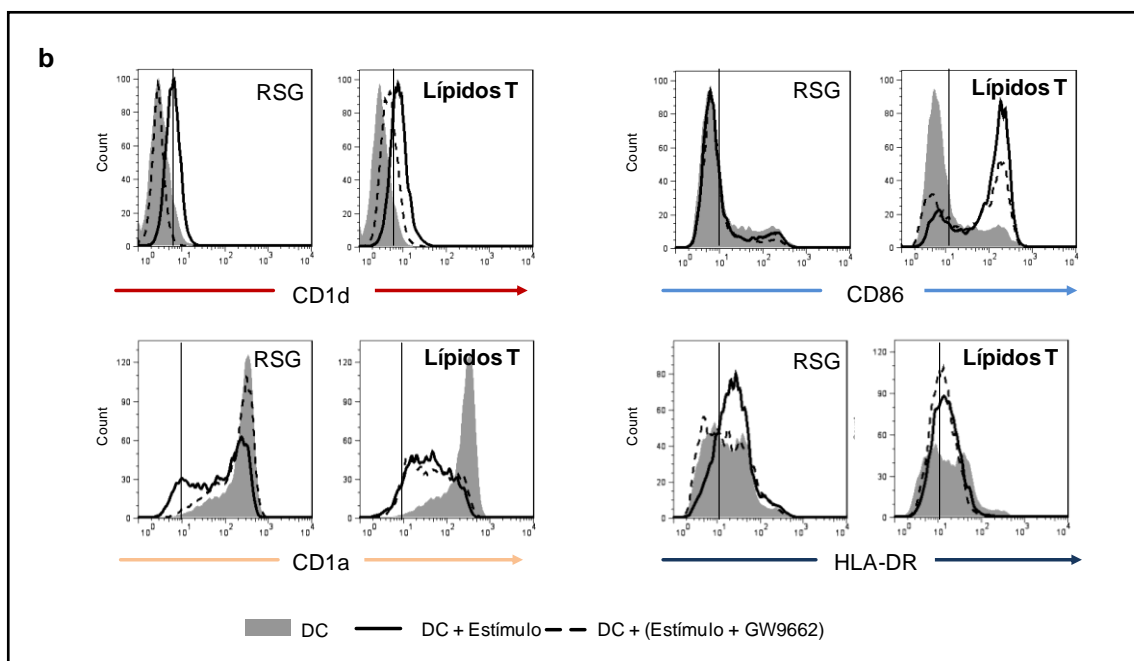


Figura 47. a) Efecto del antagonista de PPAR- γ (GW9662) en la expresión génica relativa de CD1d y CD1a en iDCs tratadas con RSG o lípidos totales del polen de olivo, durante 48 horas. Los niveles de RNAm se midieron por q-PCR a tiempo real y los valores se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. b) Ejemplo representativo de la expresión en superficie de las moléculas CD1d, CD1a, HLA-DR y CD86 ($n=2$) en las iDCs tratadas con RSG o lípidos del polen de olivo, en presencia y/o ausencia del antagonista de PPAR- γ durante 48 h.

5. Las células iNKT responden frente a iDCs tratadas con la fracción lipídica del polen de olivo.

Tras haber observado que el aumento en la expresión génica de CD1d inducido por los lípidos del polen de olivo es dependiente de la activación del factor de transcripción PPAR γ , nuestro siguiente objetivo fue estudiar la presentación de estos lípidos a células iNKT aisladas de sangre periféricas. Para ello se realizaron estudios de citotoxicidad y de secreción de citoquinas por los linfocitos iNKT y las DCs.

5.1. Los lípidos del polen de olivo inducen una disminución en la secreción de IL-12 por las DCs maduras.

Para determinar la posible influencia de los lípidos del polen de olivo sobre la activación de las DCs maduras examinamos la secreción de IL-12, IL-6, TNF- α e IL-10

en DCs tratadas con LPS, en presencia y ausencia de lípidos del polen de olivo. Como se observa en la *Figura 48*, las DCs estimuladas con LPS y lípidos de polen tienden a disminuir la secreción de IL-12 de forma dosis-dependiente respecto a las células maduras solamente en presencia de LPS. Por el contrario, la producción de IL-6, TNF- α e IL-10 no se ve afectada por la presencia de los lípidos del polen.

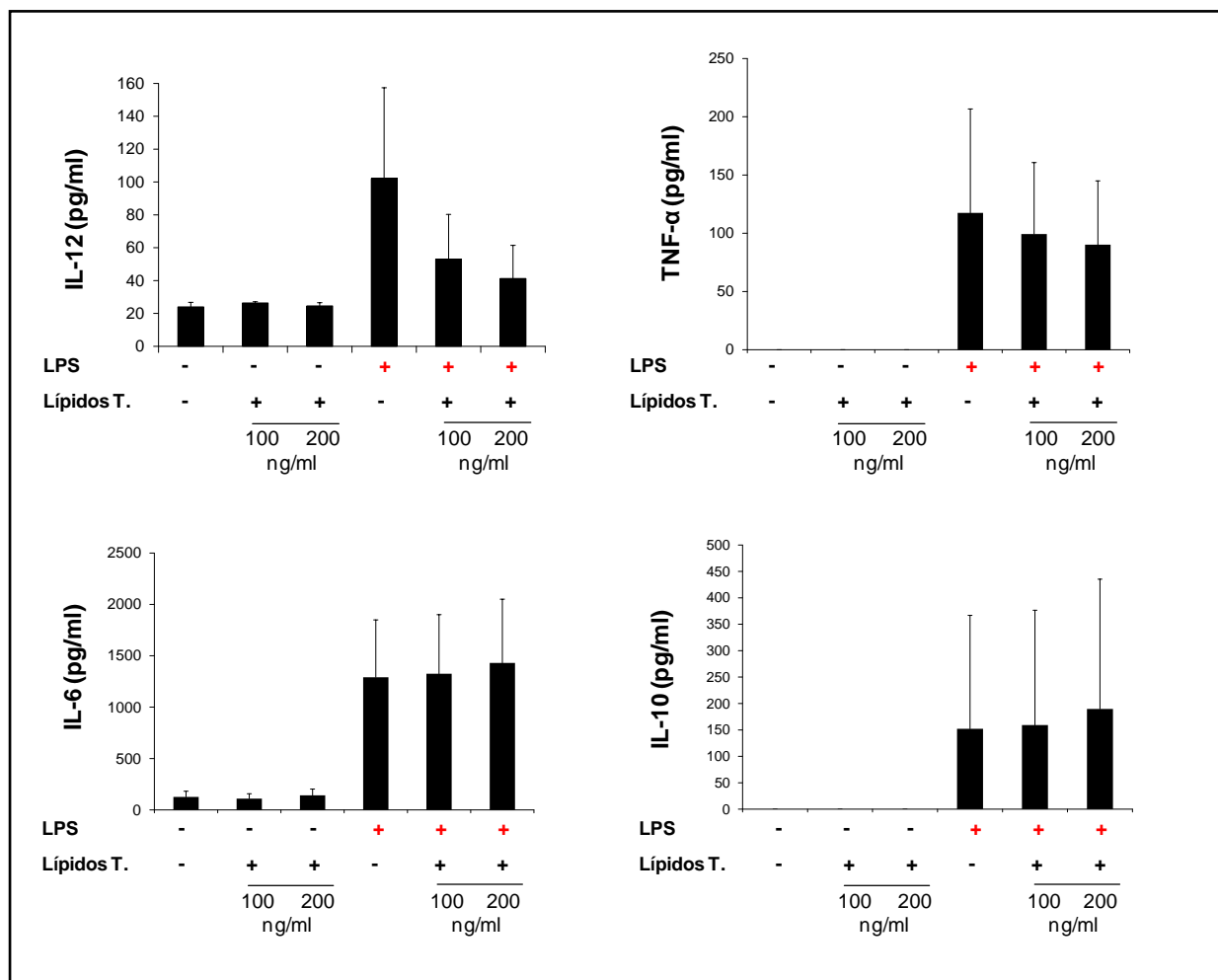


Figura 48. Detección de IL-12, IL-6, TNF- α e IL-10 producida por DCs tratadas con LPS en presencia o ausencia de lípidos del polen de olivo a las concentraciones indicadas. Los sobrenadantes fueron recogidos tras 48 h de cultivo y analizados por ELISA tipo sandwich. Se representa la media en pg/ml \pm S.D. de tres experimentos independientes.

Las células iNKT son capaces de estimular la secreción de IL-12 en presencia de un ligando antigénico (Vincent, Leslie et al. 2002), por lo que nos planteamos estudiar si al cultivar las iDCs tratadas con los lípidos en presencia de células iNKT se producía algún aumento en la secreción de esta citoquina. Efectivamente, como se muestra en la *Figura 49*, se produce un aumento en la secreción de IL-12, que además

es inhibido por el antagonista de PPAR γ . Lo mismo ocurre con las células tratadas con RSG.

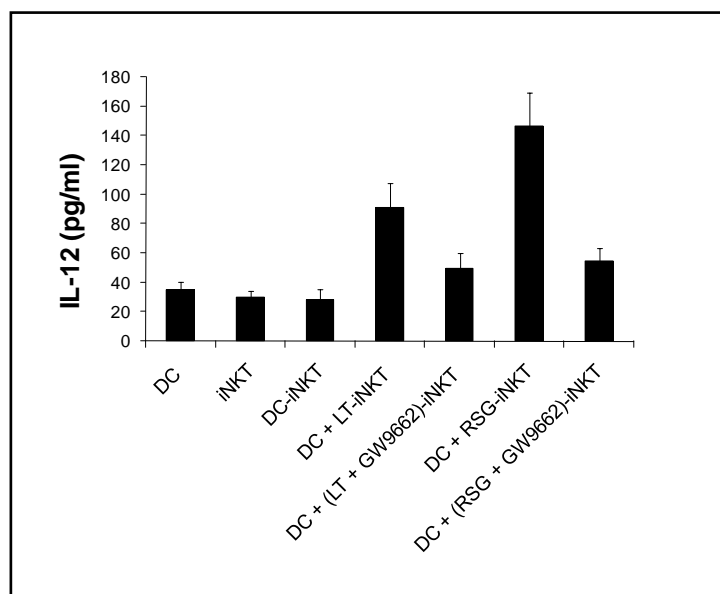


Figura 49. Secreción de IL-12 por las iDCs tratadas en ausencia y presencia de los estímulos indicados. Los sobrenadantes fueron recogidos tras 48 h de cultivo y analizados por ELISA tipo sandwich. Se muestra un experimento representativo (pg/ml \pm S.D. de los triplicados) de dos realizados.

En general podemos decir que los lípidos del polen inhiben la secreción de IL-12 inducida al tratar las DCs con LPS, mientras que no modifican la producción de IL-6, TNF- α ni IL-10, ni tampoco inducen cambios en la expresión en la superficie celular de los marcadores de maduración (*Apartado 2.2*). No obstante, se produce un aumento en la secreción de IL-12 al cultivar las iDCs estimuladas con los lípidos del polen en presencia de iNKTs; además, este incremento es dependiente de la activación de PPAR γ .

5.2. Las células iNKT son capaces de lisar las iDCs, M ϕ y monocitos tratados con lípidos del polen de olivo.

Para analizar si las iDCs tratadas con lípidos del polen eran lisadas por células iNKT se realizaron ensayos de citotoxicidad mediante la detección de lactato deshidrogenasa en el sobrenadante. Como control positivo de lisis se utilizaron iDCs tratadas con α -GalCer y como control negativo iDCs tratadas con el extracto acuoso del polen de olivo.

El resultado de los experimentos muestra que las células iNKT son capaces de lisar de forma eficiente a las iDCs tratadas con los lípidos del polen después de 4 h en co-cultivo a niveles similares, en algunos casos, a las células tratadas con α -GalCer. También las iDCs tratadas durante 48 h con ATRA son lisadas por las células iNKT de

forma significativa. Por el contrario, y como era de esperar, las iDCs cultivadas en presencia del extracto acuoso del polen, no producen efecto citotóxico en las células iNKT (Fig. 50).

Se repitió el experimento con monocitos y M ϕ , observándose igualmente un aumento significativo en el porcentaje de lisis producido por las células iNKTs frente a las células estimuladas con los lípidos (Fig. 51).

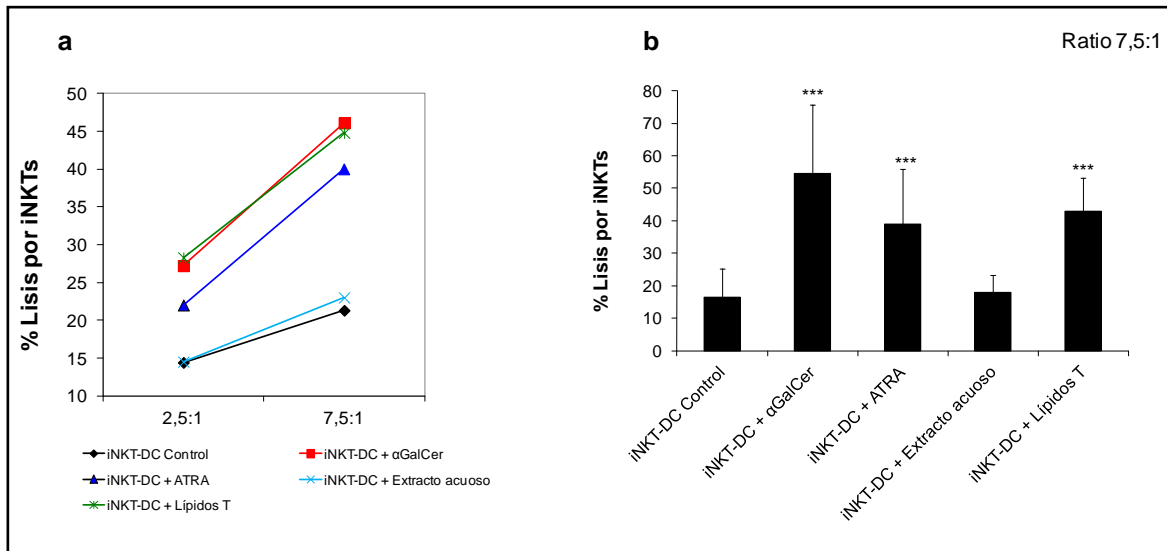
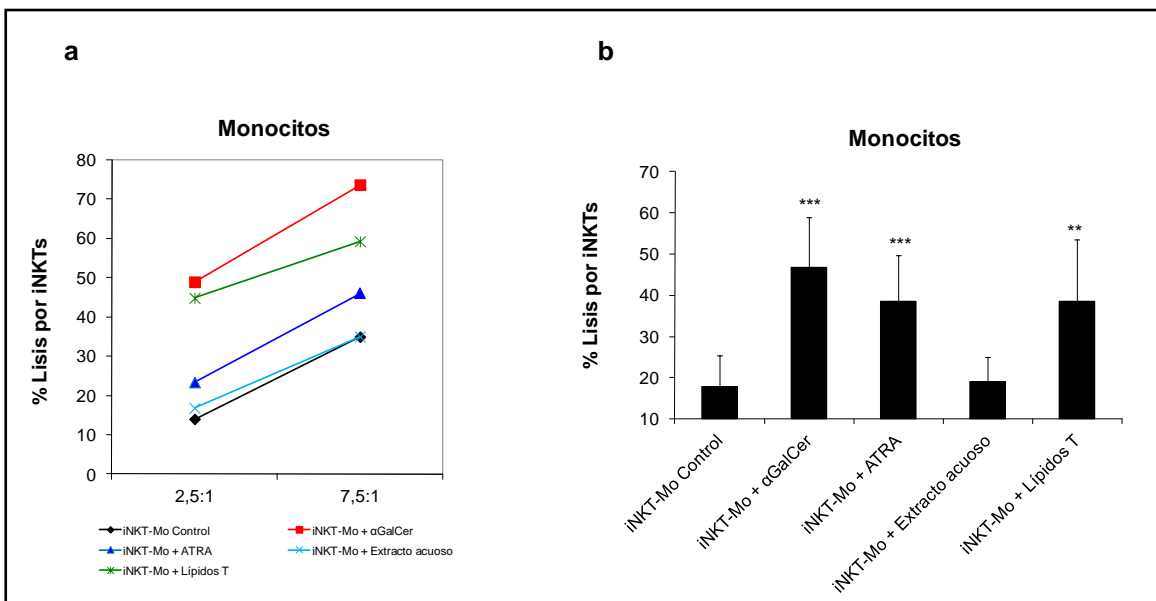


Figura 50. Porcentaje de lisis de células iNKTs ($n=10$) sobre iDCs tratadas durante 48 h con α -GalCer (α -GC), ATRA, extracto acuoso y lípidos totales del polen de olivo. a) Experimento representativo de diez realizados con las ratios iNKT:iDC, 2,5:1 y 7,5:1. b) Media \pm S.D. del porcentaje de lisis ($n=10$) por las células iNKT. Se aprecian diferencias significativas en las iDCs estimuladas con α -GalCer, ATRA y lípidos totales del polen respecto al control (***, $p<0,01$).



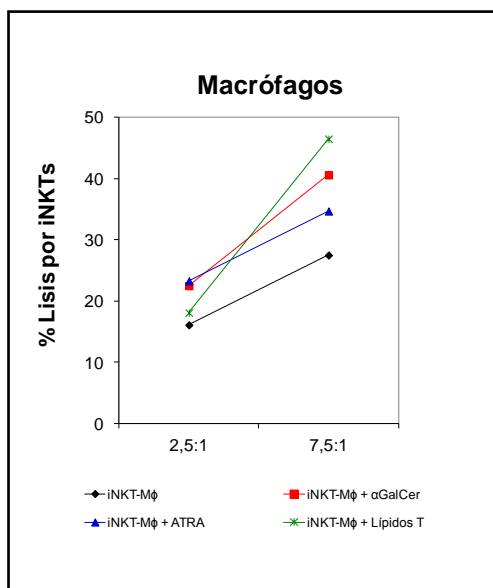


Figura 51. a) Porcentaje de lisis de monocitos estimulados en presencia de α -GalCer, ATRA, extracto acuoso y lípidos totales del polen de olivo por células iNKTs. Experimento representativo de cuatro realizados con las ratios iNKT:Monocito, 2,5:1 y 7,5:1. b) Media \pm S.D. del porcentaje de lisis de monocitos ($n=4$) por las células iNKT. Se aprecian diferencias significativas en los monocitos estimulados con α -GalCer y ATRA (**, $p<0,01$) y con lípidos totales del polen (**, $p<0,03$) respecto al control. c) Porcentaje de lisis por células iNKTs sobre Mφ tratados durante 48 h con α -GalCer, ATRA y lípidos totales del polen de olivo.

Para estudiar si el aumento en la actividad citotóxica de las células iNKT podía deberse al reconocimiento de una molécula lipídica presente entre los lípidos del polen de olivo, se realizaron ensayos de citotoxicidad de iNKTs frente a células de la línea transfectante CD1d.221 estimuladas con lípidos totales del polen. Como se puede observar en la *Figura 52*, las células iNKT no aumentan de forma significativa el porcentaje de lisis de las células tratadas con lípidos del polen respecto a las células sin tratar, a diferencia del control con α -GalCer.

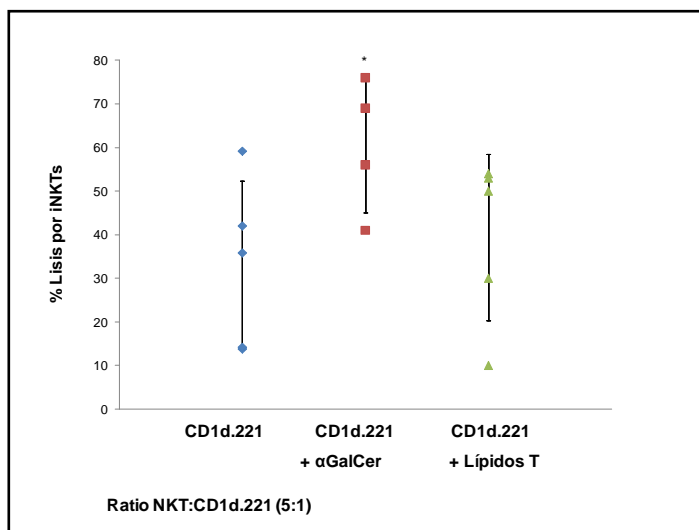


Figura 52. Media \pm S.D. del porcentaje de lisis de células iNKTs ($n=5$) sobre células de la línea transfectante CD1d.221 tratadas y sin tratar con α -GalCer o lípidos totales del polen de olivo durante 48 h. Se observan diferencias significativas en las células estimuladas con α -GalCer (*, $p<0,05$).

Como los datos anteriores no apuntaban a la existencia de un ligando antigénico entre los lípidos del polen nos planteamos determinar si el aumento de la actividad citotóxica de las células iNKT era dependiente de la activación de PPAR γ en las iDCs tratadas con los lípidos. Para ello, se realizaron ensayos de lisis con iDCs

tratadas con la fracción lipídica en presencia o ausencia del inhibidor de PPAR γ . Efectivamente, las iDCs tratadas con el antagonista GW9662 muestran una disminución significativa del porcentaje de lisis respecto a las iDCs no tratadas con el inhibidor (Fig. 53). El efecto citotóxico de las células iNKT sobre las iDCs es, por lo tanto, dependiente del aumento en la expresión de CD1d originado por la activación del factor de transcripción PPAR γ .

En conjunto, los resultados muestran que las células iNKT son capaces de lisar a las células tratadas con la fracción lipídica del polen y que este efecto puede inhibirse con el antagonista de PPAR γ .

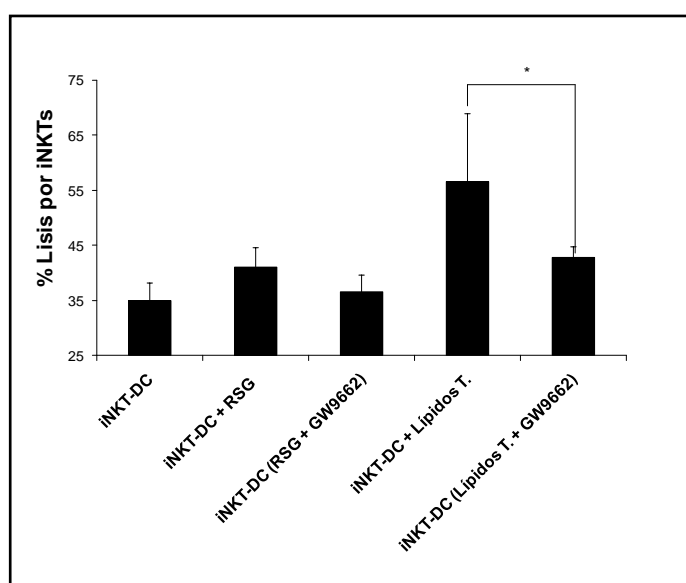


Figura 53. Media \pm S.D. del porcentaje de lisis de células iNKTs ($n=3$) sobre iDCs tratadas durante 48 h con RSG o lípidos totales del polen de olivo, en presencia o ausencia del antagonista de PPAR γ , GW9662. Se observan diferencias significativas entre las iDCs tratadas con lípidos del polen con y sin GW9662 (*, $p<0,05$).

5.3. Las células iNKT incrementan la producción de IFN γ e IL-4 frente a iDCs tratadas con lípidos del polen de olivo.

Se ha descrito que PBMCs tratadas con lípidos del polen de olivo son capaces de producir citoquinas, tanto de tipo Th1 (IFN γ) como Th2 (IL-4). Sin embargo, en estos experimentos no se podía descartar la producción de estas citoquinas por parte de otros tipos celulares distintos a las células iNKT. Así pues, el siguiente paso fue demostrar que células iNKT expandidas con α -GalCer y aisladas a partir de PBMCs de donantes sanos podían activarse y producir IFN γ e IL-4 en respuesta a iDCs tratadas con lípidos del polen de olivo.

Para este objetivo, se realizaron co-cultivos de iDCs tratadas y sin tratar con lípidos del polen junto con células iNKT, a una ratio 1:1 (iDC:iNKT) y se dejaron en condiciones estándar de cultivo durante 48 h. A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se midieron las citoquinas por ELISA tipo sándwich. Como control positivo de producción de IFN γ e IL-4, se utilizaron iDCs tratadas con α -GalCer y como control negativo se usaron iDCs tratadas con el extracto acuoso del polen de olivo.

Los resultados mostraron que las células iNKT inducían un aumento en la producción de ambas citoquinas, IFN γ e IL-4, en respuesta a las iDCs tratadas con los lípidos del polen. Es importante destacar que los mayores niveles de secreción de IL-4 e IFN- γ (mayores incluso que en las iDCs tratadas con α -GalCer) se observaron en las iDCs tratadas con ATRA y enfrentadas a células iNKT. Por el contrario y como era de esperar, no se observó ningún efecto sobre las iDCs tratadas con el extracto acuoso del polen (*Fig. 54*).

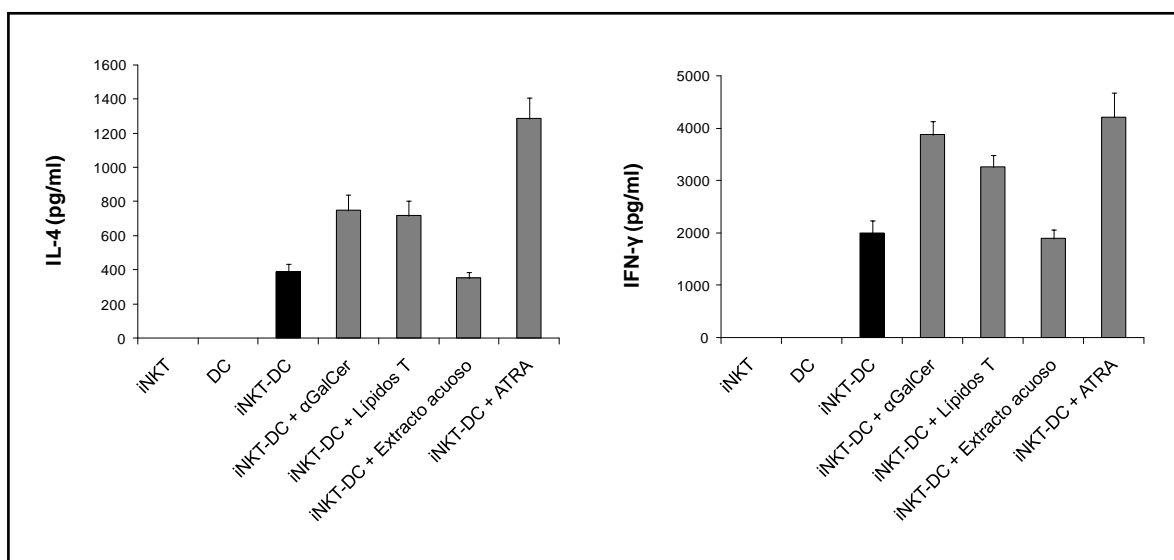


Figura 54. Detección de IFN- γ e IL-4 secretado por las células iNKT frente a DCi tratadas en ausencia y presencia de los estímulos indicados. Los sobrenadantes fueron recogidos tras 48 h de cultivo y analizados por ELISA tipo sandwich. Se representa un experimento representativo de tres realizados (pg/ml \pm S.D. de los triplicados).

Tras analizar la producción de IL-4 e IFN- γ , evaluamos el efecto de los lípidos del polen sobre la secreción de IL-10 como ejemplo de citoquina inmunosupresora. En los ensayos del *Apartado 4.1*, habíamos observado que las iDCs tratadas con lípidos de polen no producían IL-10. Al cultivar las iDCs tratadas con los lípidos en presencia de células iNKT no apreciamos ninguna variación en la secreción de esta citoquina respecto al control (*Fig. 55*). Es decir, los lípidos del polen activan la secreción de IL-4 e IFN- γ por las células iNKT pero no inducen la producción de IL-10.

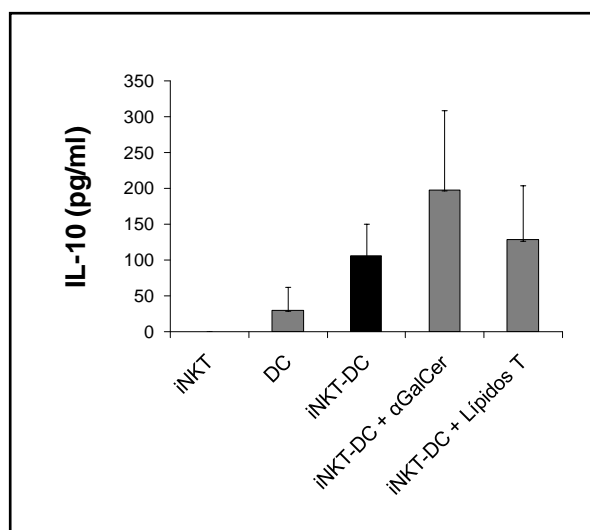


Figura 55. Secreción de IL-10 con los estímulos indicados en la figura. Los sobrenadantes fueron recogidos tras 48 h de cultivo y analizados por ELISA tipo sandwich. Se representa la media (pg/ml) \pm S.D. de tres experimentos independientes.

6. Análisis y separación de los componentes lipídicos del polen del olivo y efecto sobre las iDCs derivadas de monocitos.

Puesto que las iDCs eran capaces de producir una respuesta sobre las células iNKT al ser tratadas con los lípidos del polen, el siguiente objetivo fue determinar la fracción o fracciones responsables de dicho efecto. Para ello, se realizó una separación y aislamiento de los diferentes lípidos presentes en el extracto lipídico total del polen y se estudió su acción sobre las iDCs y las células iNKT.

6.1. Separación de las especies lipídicas del polen de olivo.

Para separar los distintos componentes lipídicos se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) en placa de silica. Los principales lípidos presentes en el polen de olivo son: fosfolípidos (PL), glucolípidos (GL), diglicéridos (DG), ácidos grasos libres (AG libres), triglicéridos (TG) y esteroides (Es) (Rodríguez-Rosales, Ferrol et al. 1990).

Las distintas especies lipídicas fueron identificadas atendiendo a la migración relativa en el disolvente (cloroformo/ metanol/ agua, 70:30:1 por vol.) en la placa de silica. Así, las distintas bandas obtenidas en la placa de mayor a menor grado de polaridad (de abajo a arriba) son: PLs y GLs (lípidos polares), DGs, colesterol (Ch), AGs libres y TGs (Fig. 56).

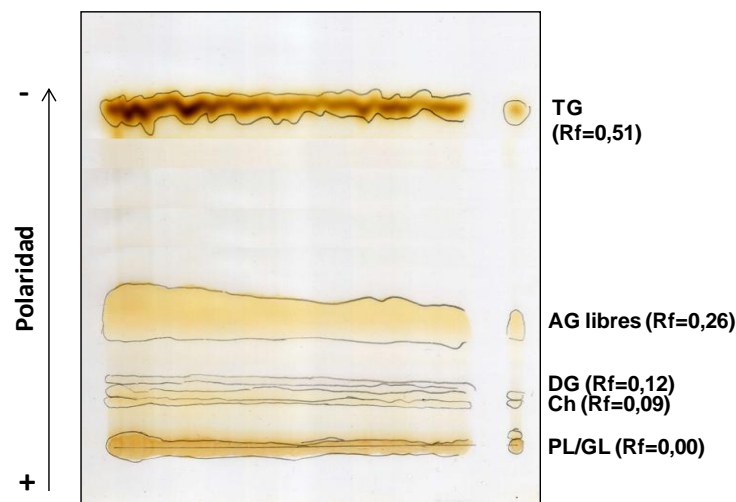


Figura 56. Separación por cromatografía en capa fina (TLC) de las distintas fracciones lipídicas presentes en el polen de olivo según su grado de polaridad en el disolvente. Las principales especies representadas son: lípidos polares, diacilglicerol (DG), colesterol (Ch), ácidos grasos libres (AG) y triacilgliceroles (TG). Rf representa la movilidad relativa de cada especie lipídica respecto a la migración del frente

6.2. Efecto de las distintas fracciones lipídicas aisladas del polen de olivo sobre iDCs.

Después de separar los distintos componentes lipídicos del polen de olivo según su grado de polaridad se examinó el efecto de los lípidos polares (PL y GL), DGs, AGs libres y TGs sobre el fenotipo de las iDCs. Para ello, se realizó la extracción de los lípidos de la placa de silica con cloroformo/metanol y a continuación, fueron secados en atmósfera inerte de nitrógeno. Al igual que en el caso de los lípidos totales del polen todas las fracciones fueron disueltas en DMSO y añadidas a las iDCs a distintas concentraciones. Se efectuó el análisis por citometría de flujo de CD1d a las 24 y 48 h. Como muestran los resultados, todas las fracciones aumentan la expresión en superficie de CD1d en las iDCs. No obstante, en presencia de la fracción de lípidos polares la expresión aumenta hasta la concentración máxima utilizada (150 ng/ml) mientras que con el resto de las fracciones el máximo de expresión se alcanza a 100 ng/ml (Fig. 57).

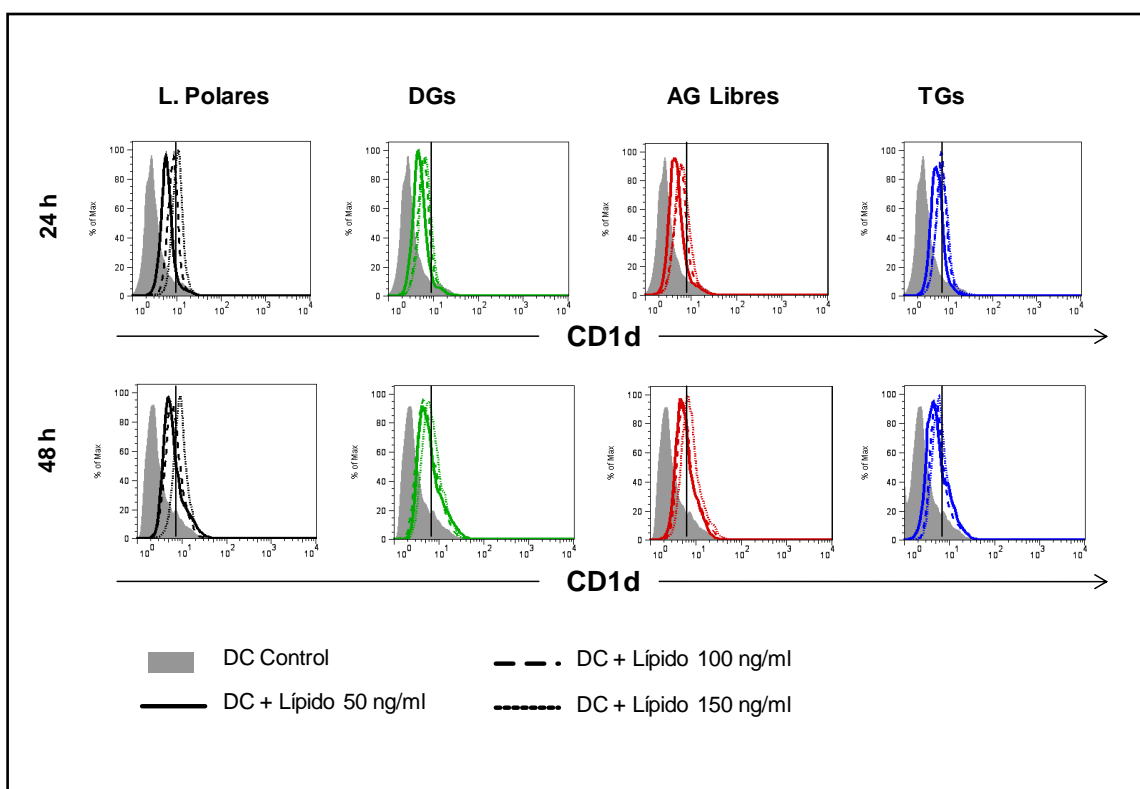


Figura 57. Expresión en superficie de CD1d en iDCs tratadas a distintas concentraciones de cada una de las fracciones lipídicas aisladas en la TLC: lípidos polares, DGs, AGs libres y TGs tras 24 y 48 h de cultivo.

En la *Figura 58* se observa que efectivamente el incremento de CD1d es significativo con cada una de las fracciones lipídicas evaluadas, pero con un mayor nivel de significación en el caso de los lípidos polares y los AG libres. Por otro lado, las iDCs no experimentan cambios en la expresión de CD1a, solamente se observa una tendencia (no significativa) hacia niveles menores de CD1a en las iDCs tratadas con AG libres. Respecto a los marcadores de maduración, HLA-DR y CD86, se aprecia una tendencia hacia niveles mayores de CD86 con cada una de las fracciones lipídicas, pero ésta sólo fue estadísticamente significativa en el caso de las células tratadas con la fracción de lípidos polares.

También determinamos la expresión de estos marcadores en las iDCs estimuladas durante 5 días desde el primer día de diferenciación. Como se observa en la gráfica de dosis-respuesta (*Fig. 59*) el comportamiento de CD1d es similar al de la estimulación de las iDCs ya diferenciadas. Con los lípidos apolares el máximo de expresión se alcanzaba a 100 ng/ml, mientras que con los lípidos polares seguía aumentando al tratar las iDCs a una concentración de 150 ng/ml.

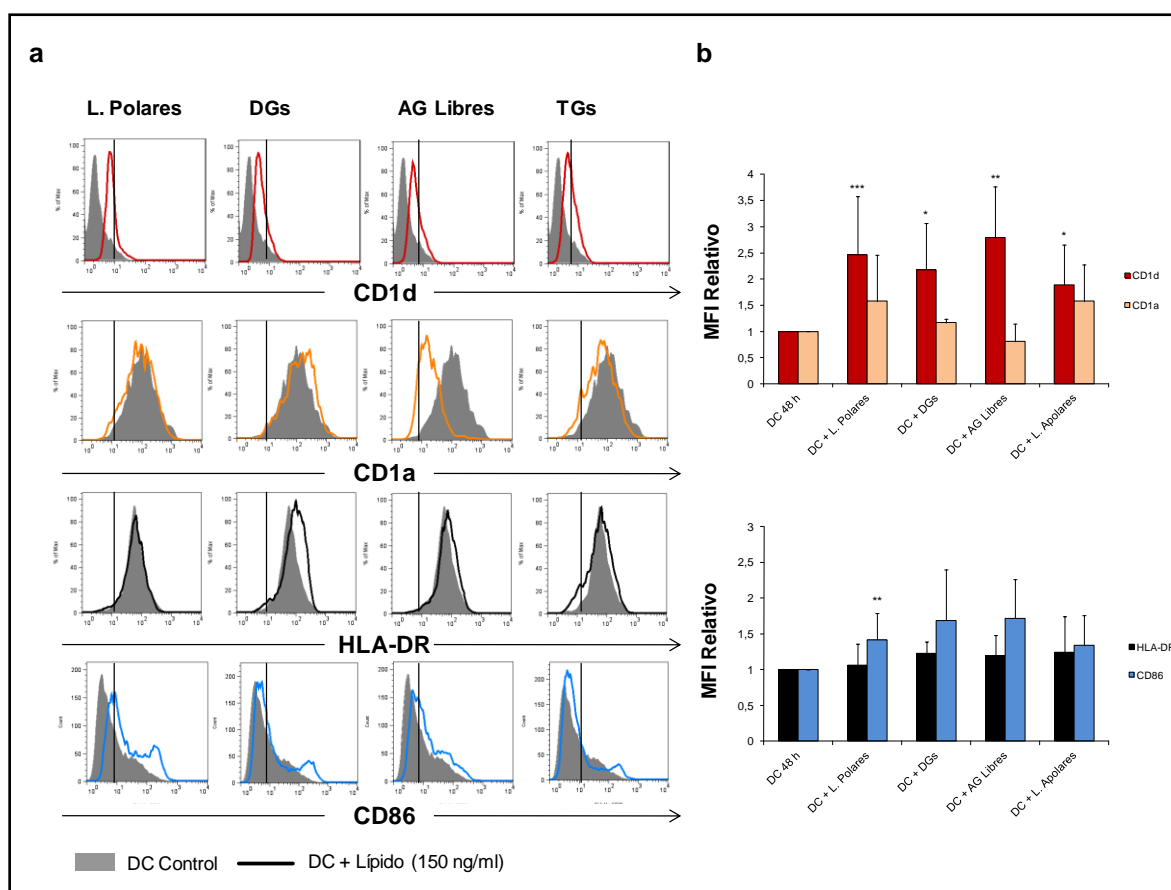


Figura 58. Expresión en superficie de las moléculas CD1d, CD1a, HLA-DR y CD86 en iDCs estimuladas con las especies lipídicas derivadas del polen de olivo: L. Polares, DGs, AG libres y TGs tras 48 h en cultivo. a) Experimento representativo. b) MFI relativa \pm S.D. de los distintos marcadores: CD1d y CD1a ($n=10$), HLA-DR y CD86 ($n=7$) en las iDCs tratadas con los lípidos. Aparecen diferencias significativas en la expresión de CD1d en las iDCs tratadas con cada una de las fracciones (L. polares: ***, $p<0,01$; AG libres: **, $p<0,03$; DG y L. apolares: *, $p<0,05$) y en CD86 en las estimuladas con la fracción de lípidos polares (**, $p<0,03$) respecto a las iDCs control.

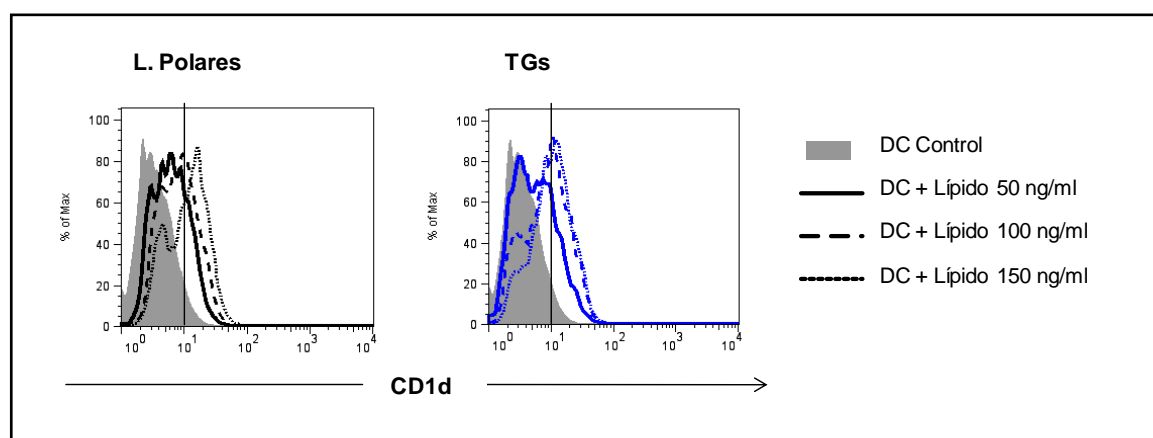


Figura 59. Expresión en superficie de CD1d en iDCs tratadas con concentraciones crecientes de lípidos polares o TGs durante 5 días desde el primero de diferenciación.

Al igual que en el caso de las iDCs ya diferenciadas el aumento de CD1d es mayor y con un nivel más alto de significación en las células tratadas con la fracción de lípidos polares y de AG libres como se observa en la Fig. 60b.

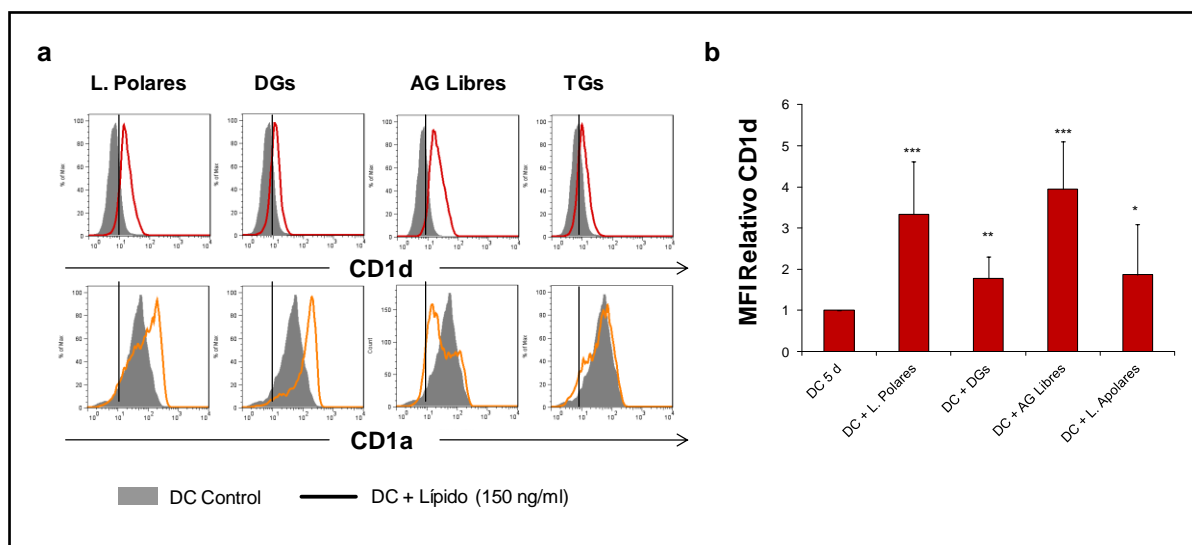


Figura 60. Expresión en superficie de las moléculas CD1d, CD1a, HLA-DR y CD86 en iDCs estimuladas con las especies lipídicas derivadas del polen de olivo: L. Polares, DGs, AG libres y TGs durante 5 días desde el primero de diferenciación. a) Experimento representativo. b) MFI relativa \pm S.D. de CD1d ($n=5$) en las iDCs tratadas con los estímulos citados anteriormente. Aparecen diferencias significativas en la expresión de CD1d en las DCs tratadas con cada una de las fracciones lipídicas (L. polares y AG libres: ***, $p<0,01$; DG/Ch: **, $p<0,03$ y L. apolares: *, $p<0,05$) respecto a las células control.

Sobre el efecto de la fracción de lípidos polares y de TGs en las iDCs cultivadas en suero humano, los resultados muestran un incremento en la expresión de CD1d, mayor también al tratar las células con la fracción de lípidos polares. Por otra parte, CD1a sufre un aumento de expresión en superficie, tanto con los lípidos polares como con los TGs, de forma similar al efecto de los lípidos totales en las iDCs cultivadas en suero humano (Fig. 61).

De manera general, podemos decir que la fracción de lípidos polares y de AG libres del polen de olivo producen un aumento mayor que el resto de las fracciones lipídicas en la expresión de CD1d en iDCs diferenciadas tratadas durante 48 h, iDCs tratadas desde el primer día de diferenciación y en las células cultivadas en suero humano

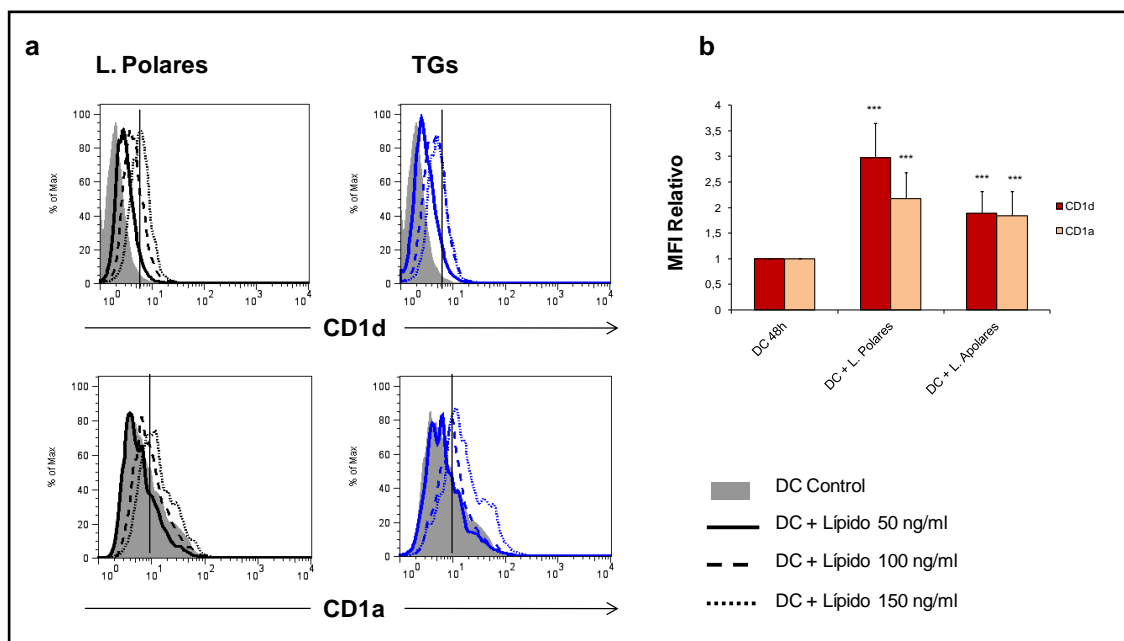


Figura 61. Efecto de las fracciones lipídicas (L. polares y TGs) sobre la expresión de CD1d y CD1a sobre iDCs cultivadas en suero humano tras 48 h. a) Histogramas representativos de tres experimentos realizados. b) MFI relativo \pm S.D. de CD1d y CD1a ($n=3$). Aparecen diferencias significativas en la expresión de CD1d y CD1a en las células estimuladas tanto con la fracción de lípidos polares como de TGs (***, $p<0,01$).

6.3. La fracción de ácidos grasos libres (AG) del polen de olivo aumenta la expresión de CD1d a nivel transcripcional en iDCs.

Se evaluaron los niveles de RNAm de las moléculas CD1 en iDCs tratadas con cada una de las fracciones lipídicas. Los datos de expresión génica muestran un incremento significativo de CD1d en las iDCs tratadas con la fracción de AG libres respecto a las células control (Fig.62). Se observa también una tendencia hacia niveles mayores de expresión de CD1d en las células cultivadas en presencia de TGs (no significativa) mientras que las células tratadas con la fracción de lípidos polares no varían su expresión. Respecto a las moléculas CD1 del grupo I, éstas no sufren cambios significativos con ninguno de los componentes lipídicos evaluados, sin embargo, se aprecia una tendencia hacia niveles menores de CD1a con la fracción de AG libres.

Estos resultados apuntan a la fracción de AG libres como la responsable del aumento en la expresión génica de CD1d inducido por los lípidos totales del polen de olivo. Por otra parte, la fracción de lípidos polares es capaz de aumentar la expresión proteica de CD1d por un mecanismo no transcripcional.

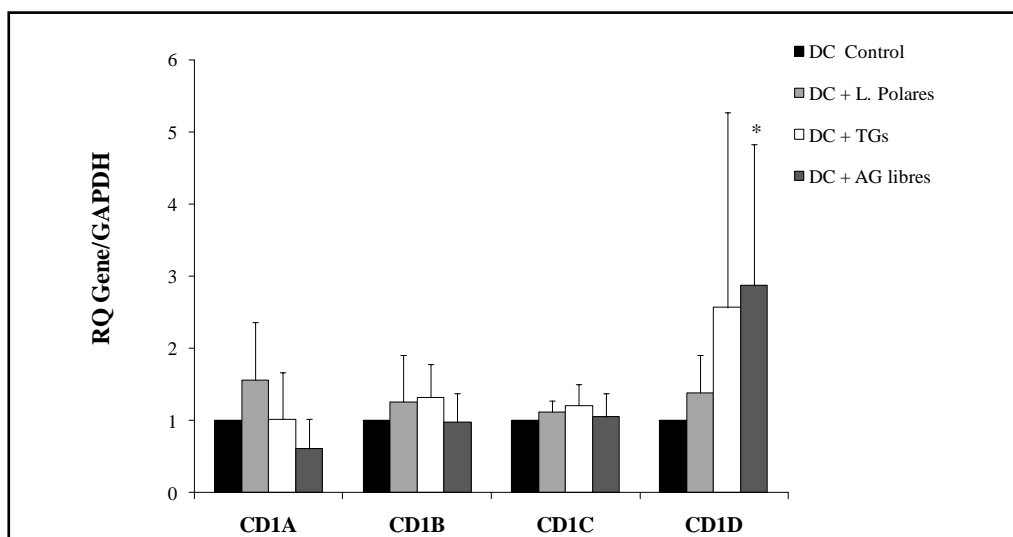
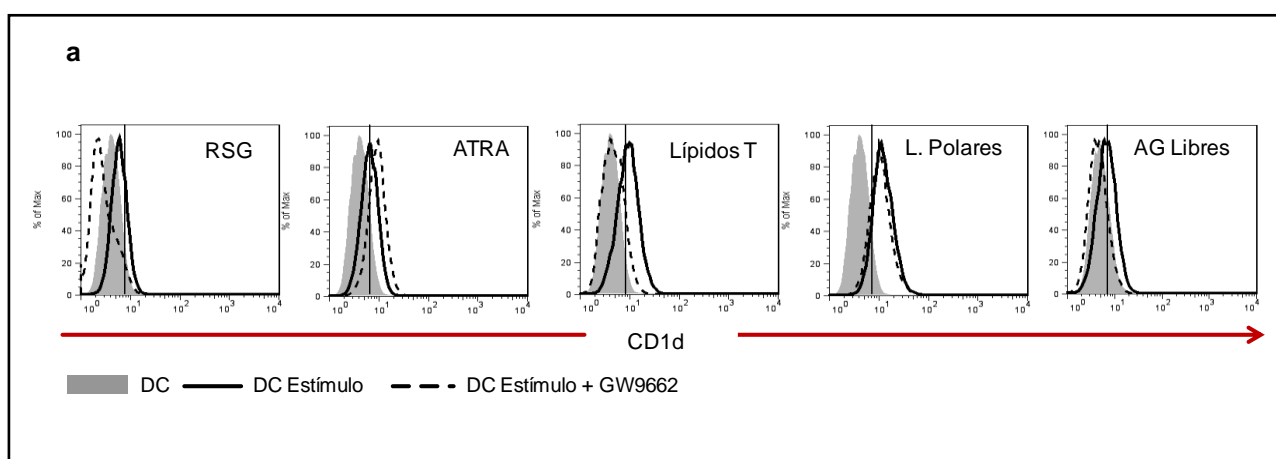


Figura 62. Expresión génica relativa de *CD1d*, *CD1a*, *CD1b* y *CD1c* en iDCs tratadas con la fracción de lípidos polares, TGs y AG libres derivadas del polen de olivo durante 48 h. Los niveles de RNAm fueron medidos por q-PCR a tiempo real y normalizados a la expresión de GAPDH. Los datos representan la media \pm S.D. de la expresión génica para las moléculas *CD1d* ($n=7$), *CD1a*, *CD1b* y *CD1c* ($n=3$). Los resultados mostraron un aumento significativo de *CD1d* en las iDCs tratadas con los ácidos grasos libres (*, $p<0,05$) respecto a las células sin tratar.

Para examinar la posible activación del factor de transcripción PPAR γ por las fracciones lipídicas se trataron las iDCs con el inhibidor GW9662, y se analizó la expresión de *CD1d* en la superficie celular y el RNAm. Como se observa en la *Figura 63*, GW9662 no fue capaz de inhibir el aumento en superficie de *CD1d* producido por los lípidos polares; por el contrario, los AG libres disminuyeron los niveles de expresión de *CD1d*, mostrando dependencia de PPAR γ . A nivel de RNAm la fracción de lípidos polares no indujo diferencias significativas sobre *CD1d* en ausencia o presencia del antagonista de PPAR γ (*Fig. 64*).



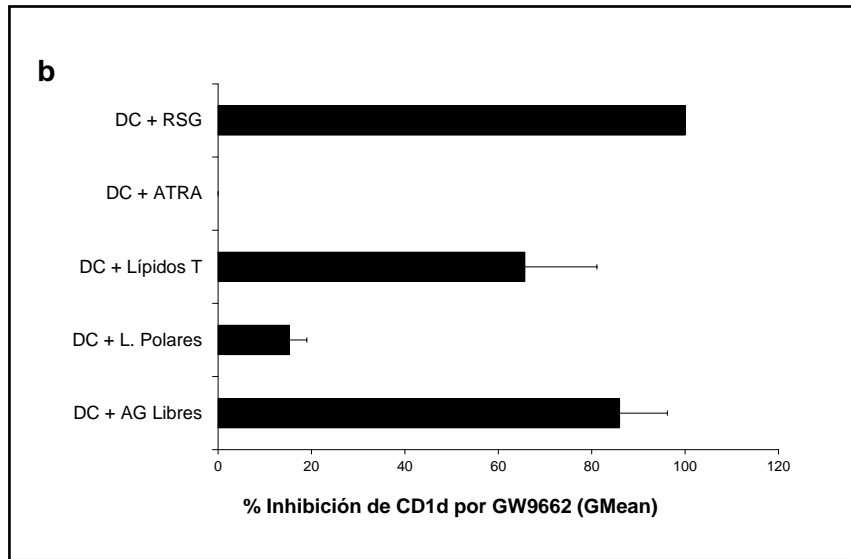


Figura 63. Expresión en superficie de CD1d en IDCs tratadas con RSG, ATRA, lípidos totales del polen de olivo, lípidos polares o AG libres del polen, en presencia y/o ausencia del antagonista de PPAR- γ GW9662 durante 5 días desde el primer día de diferenciación. a) Histogramas representativos de cuatro experimentos realizados. b) Porcentaje de inhibición de CD1d (MFI) por el antagonista de PPAR- γ (n=4) en las células tratadas con los estímulos indicados.

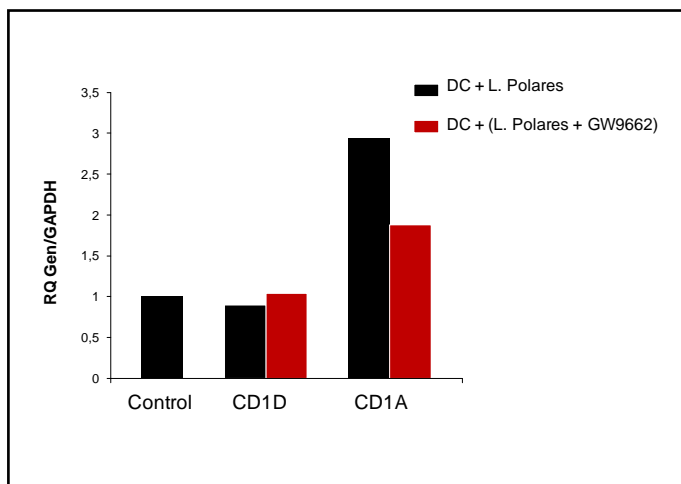


Figura 64. Efecto del antagonista de PPAR γ GW9662 en la expresión génica relativa de CD1d y CD1a en iDCs tratadas con la fracción de lípidos polares del polen de olivo desde el primer día de diferenciación, durante 5 días. Los niveles de RNAm se midieron por q-PCR a tiempo real y los valores se normalizaron respecto a GAPDH. Se muestra un experimento representativo.

Los resultados muestran que la fracción de lípidos polares es capaz de aumentar CD1d en la superficie celular, sin aumentar la transcripción génica y sin activar PPAR γ .

6.4. Separación y efecto de los fosfolípidos (PLs) presentes en la fracción polar de los lípidos del polen de olivo sobre iDCs.

Para estudiar más específicamente los componentes de la fracción polar de los lípidos del polen se realizó una cromatografía bi-dimensional en capa fina. Como resultado se obtuvieron 4 especies lipídicas principales con diferentes migraciones relativas (*Fig. 65*). Estas especies fueron rascadas y extraídas de la silica con cloroformo/metanol, secadas en atmósfera de N₂ y disueltas en DMSO. Estudios previos sobre la composición lipídica del polen de olivo señalaban como principales PLs presentes en el mismo: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA) (Rodríguez-Rosales, Ferrol et al. 1990).

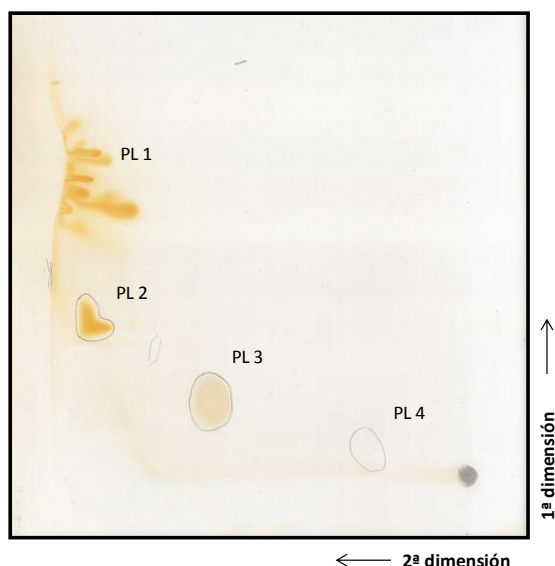


Figura 65. Separación por cromatografía en capa fina (TLC) bi-dimensional de los distintos fosfolípidos presentes en el polen de olivo. Aparecen cuatro especies principales en la placa de silica denominadas PL 1, PL 2, PL 3 y PL 4.

A continuación, se analizó la expresión de las moléculas CD1d y CD1a en iDCs cultivadas en presencia de cada uno de los PLs. Como se muestra en la *Figura 66*, todos los PLs aumentan la expresión de CD1d en la superficie celular, pero el incremento más significativo se produjo con el PL correspondiente a la mancha 4 de la placa de silica. CD1a también sufre un leve pero significativo incremento respecto a las células control con las fracciones PL1, PL3 y PL4. Por otro lado, los datos de q-PCR a tiempo real confirman que el aumento de CD1d no es debido a un aumento en la transcripción del gen, como ya se había observado con la fracción total de lípidos polares.

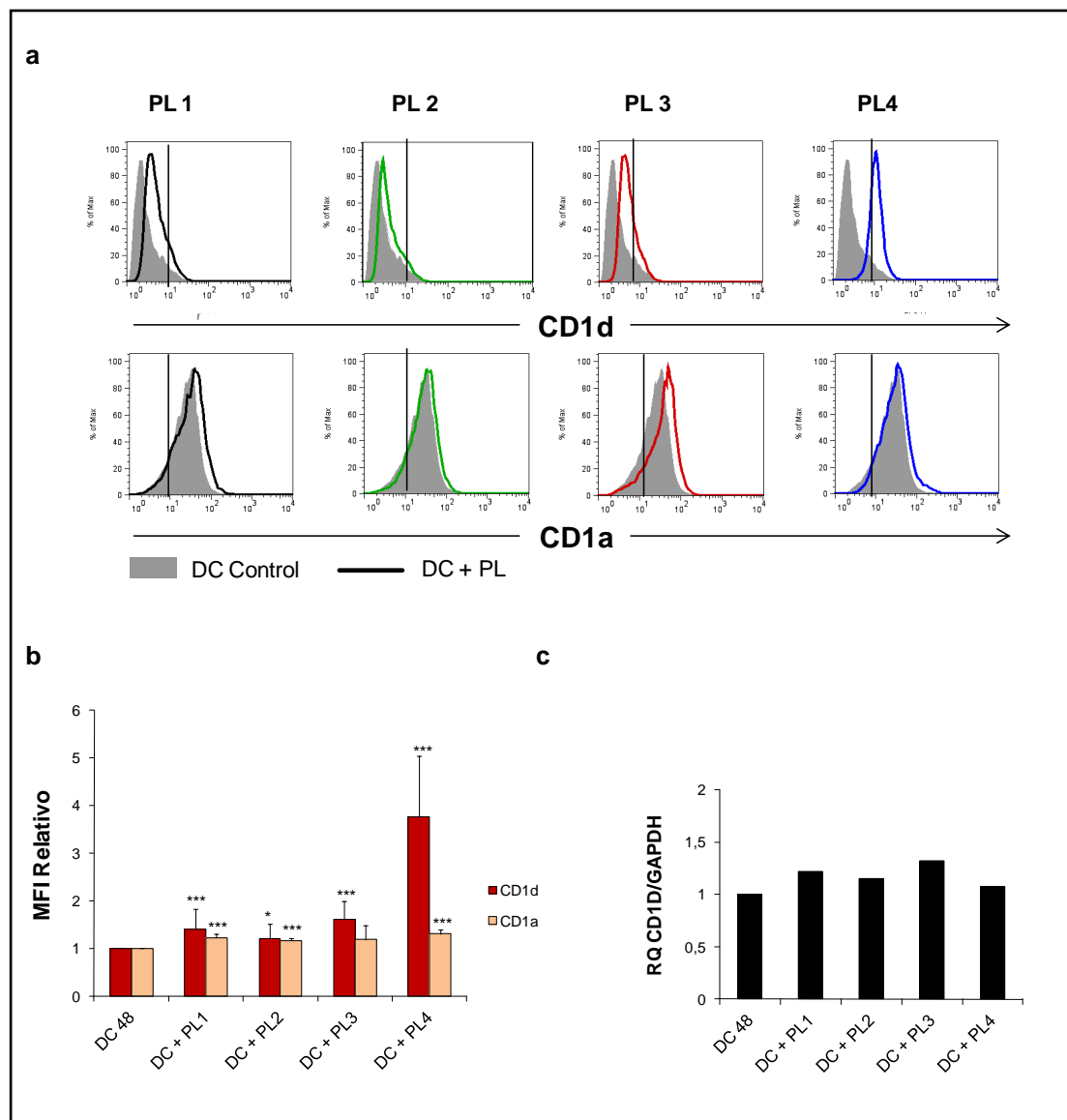


Figura 66. Expresión en superficie de las moléculas CD1d y CD1a en iDCs tratadas durante 48 h con cada uno de los PLs derivados del polen de olivo. A) Histogramas representativos. b) Media \pm S.D. de expresión relativa de CD1d (n=9) y CD1a (n=3) en las iDCs tratadas con cada PL. Aparecen diferencias significativas en la expresión de CD1d en las iDCs tratadas con los cuatro PLs (PL1, PL3 y PL4, ***, $p < 0,01$; PL2, *, $p < 0,05$) y CD1a en las iDCs estimuladas con PL1, PL2 y PL4 (***, $p < 0,01$). c) Expresión génica relativa de CD1d en iDCs tratadas con los distintos PLs derivados del polen de olivo durante 48 h. Los niveles de RNAm fueron medidos por q-PCR a tiempo real y normalizados a la expresión de GAPDH. Experimento representativo de dos realizados.

Se determinó también el efecto de las fracciones de PLs sobre otras células que expresan CD1d: monocitos y linfocitos B. CD1d aumenta en los monocitos

tratados con la fracción 4 respecto a las células control, sin embargo, los linfocitos B no sufren ningún cambio en su expresión en la superficie celular (*Fig. 67*).

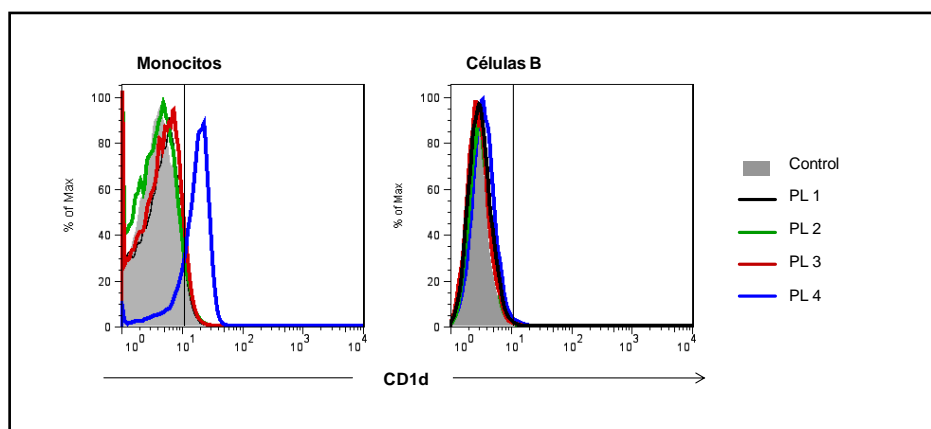


Figura 67. Expresión en superficie de CD1d en monocitos y linfocitos B tratados durante 48 h con cada uno de los PLs derivados del polen de olivo.

Los resultados confirman que cada uno de los PLs aislados en la cromatografía bi-dimensional es capaz de aumentar la expresión de CD1d en la superficie celular por una vía diferente a la transcripcional.

6.5. Efecto de PLs sintéticos y purificados sobre la expresión de CD1d en iDCs.

A la vista del efecto que se había observado con la fracción de lípidos polares del polen sobre la expresión de CD1d, y principalmente de la fracción PL4, examinamos distintos PLs sintéticos y purificados de soja (Avanti Polar Lipids, USA) para comprobar si eran capaces de mimetizar el efecto de los PLs del polen de olivo sobre las iDCs. Para ello, distintas especies moleculares de PI, PE y PC se disolvieron en DMSO y fueron añadidas a los cultivos celulares a diferentes concentraciones.

Como se muestra en la *Figura 68* no hay incrementos significativos en la expresión de CD1d, lo que indica que los resultados obtenidos anteriormente son específicos de lípidos presentes en el polen de olivo y no generales de cualquier lípido.

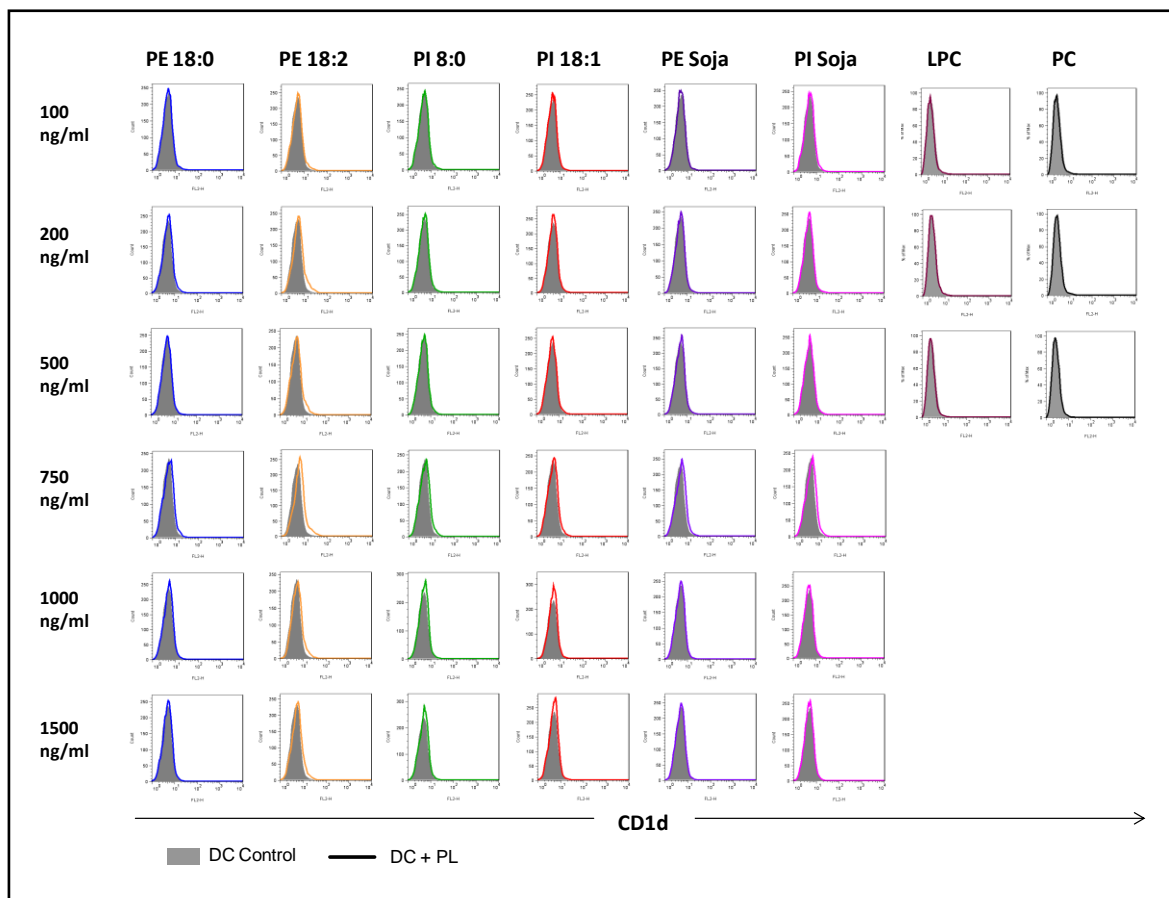


Figura 68. Expresión en superficie de CD1d en iDCs tratadas durante 48 h con distintos PLs sintéticos y purificados de soja a las concentraciones indicadas (n=8).

6.6. Estudio de posibles mecanismos de aumento de expresión proteica de CD1d producido por los PLs del polen de olivo.

Para tratar de dilucidar el posible mecanismo por el cual los PLs del polen de olivo eran capaces de aumentar la expresión de CD1d evaluamos inicialmente si se producía un aumento en la síntesis de la proteína. Para ello, se realizó un marcaje intracelular de CD1d en las iDCs tratadas y sin tratar con los lípidos polares del polen. Como se observa en la *Figura 69*, se produce un aumento de proteína total respecto a las células control, al igual que con la fracción lipídica total y con el ATRA. Este resultado apoya el hecho de que los lípidos polares del polen de olivo incrementan la síntesis “de novo” de CD1d, sin modificar los niveles de RNAm, apuntando hacia posibles mecanismos post-transcripcionales y descartando que este aumento sea debido a la traslocación y estabilización de la proteína en la superficie celular.

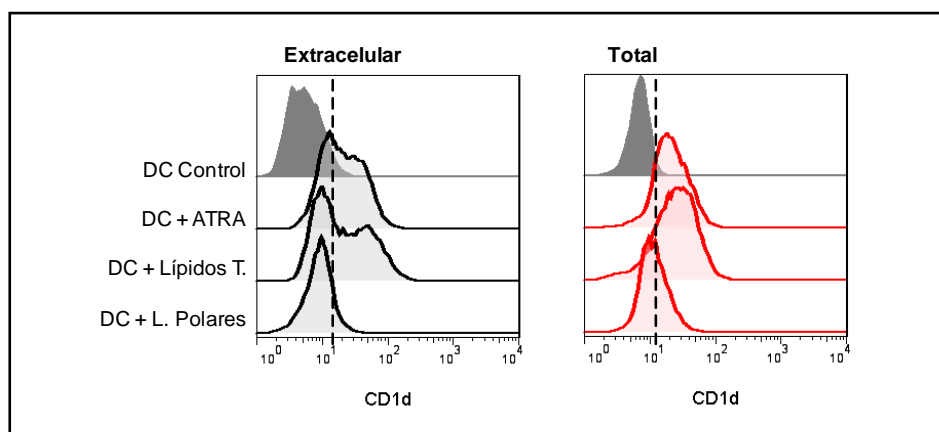


Figura 69. Expresión en superficie e intracelular de CD1d en iDCs tratadas y sin tratar con ATRA, lípidos totales del polen o lípidos polares durante 48 h. Experimento representativo de tres realizados.

Entre los posibles mecanismos postranscripcionales responsables del aumento en la expresión de CD1d se barajó la hipótesis de un factor soluble secretado por las iDCs al medio al ser tratadas con los lípidos polares. Se cultivaron las células desde el primer día de diferenciación en presencia y ausencia de la fracción polar, y posteriormente se recogió el sobrenadante y se cultivaron iDCs con ese sobrenadante durante 48 h. Como se muestra en la *Figura 71*, no se produce incremento de CD1d en superficie en las DCs cultivadas con el sobrenadante, indicando que no hay ningún factor soluble responsable del aumento en su expresión.

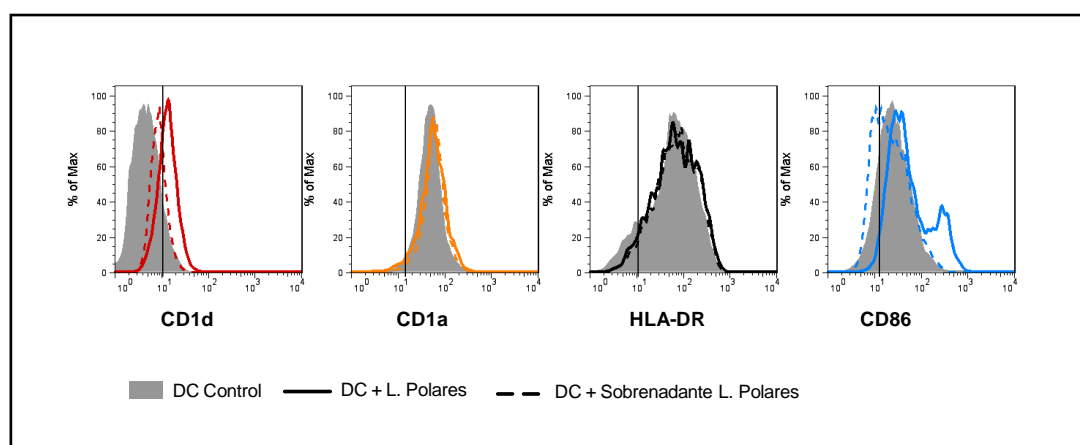


Figura 70. Expresión en superficie de CD1d, CD1a, HLA-DR y CD86 en iDCs tratadas y sin tratar con la fracción de lípidos polares o con el sobrenadante de las células tratadas con los lípidos polares durante 48 h. Experimento representativo de dos realizados.

Por otro lado, consideramos que quizás el aumento de expresión de CD1d podía estar provocado por una inhibición en el proceso de ubiquitinización y posterior

degradación de CD1d en el proteasoma. Es decir, en vez de estimular su síntesis podía ser que su degradación por el proteasoma estuviera inhibida al tratar las iDCs con los lípidos polares del polen. Para intentar probar esta hipótesis, se trataron las iDCs con los lípidos polares del polen en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG-132. Sin embargo, como se muestra en la *Figura 72*, no se produce ningún aumento en la expresión de CD1d ni en las iDCs control ni en las células tratadas con los lípidos polares en presencia del inhibidor de proteasoma.

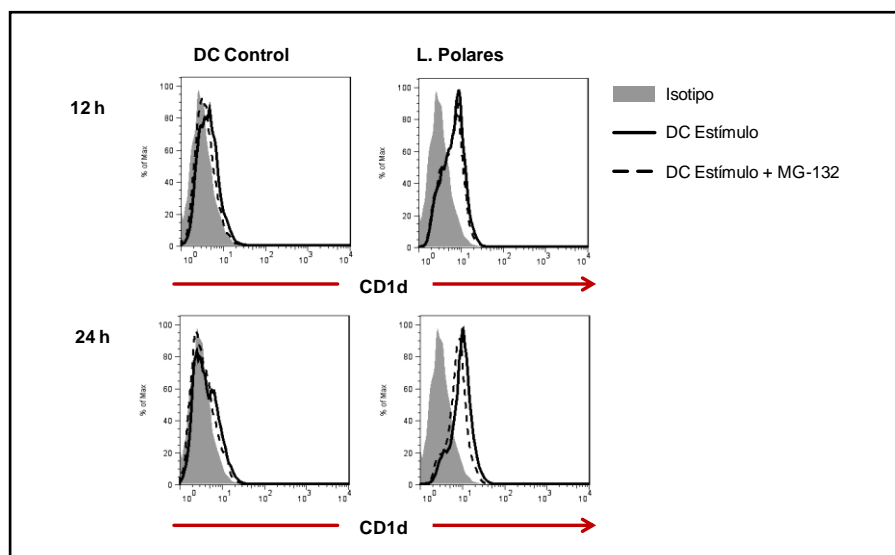


Figura 71. Expresión en superficie de CD1d en iDCs tratadas y sin tratar durante 12 y 24 h con lípidos polares del polen en presencia o ausencia del inhibidor específico del proteasoma MG-132. Experimento representativo de dos realizados.

Nuestros resultados no pudieron concluir en el mecanismo de inducción de CD1d generado por los lípidos polares del polen.

7. Estudio de la activación de células iNKT por las iDCs tratadas con las fracciones lipídicas aisladas del polen de olivo.

Después de estudiar el efecto de las distintas especies lipídicas procedentes del polen sobre CD1d en iDCs, evaluamos la posible activación de las células iNKT frente a las iDCs tratadas con la fracción de lípidos polares, de AG libres y de TGs. Para ello se realizaron estudios de citotoxicidad y de producción de citoquinas (IFN- γ e IL-4).

En los ensayos de citotoxicidad se observa un incremento significativo del porcentaje de lisis de las iDCs tratadas con la fracción de lípidos polares y de AG libres respecto a las células control por las células iNKT; sin embargo, no se aprecian cambios significativos con los TGs (Fig. 72).

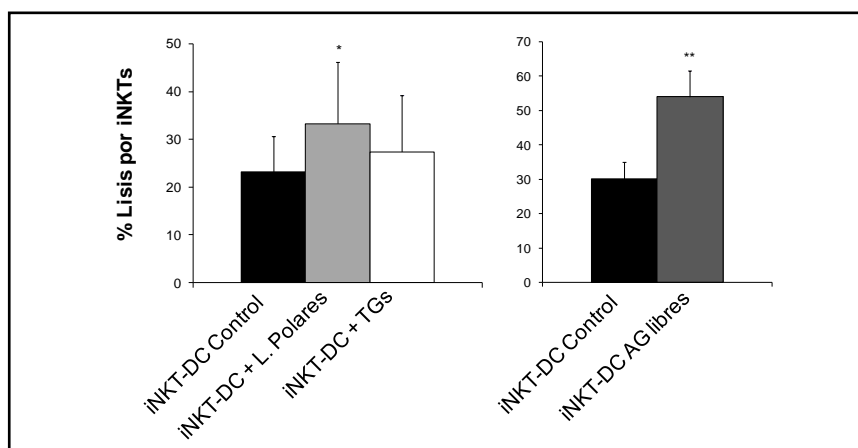


Figura 72. a) Porcentaje de lisis de células iNKT sobre iDCs tratadas durante 48 h con lípidos polares, TGs (n=5) y AG libres (n=3) del polen de olivo. Se muestra la media \pm S.D. del porcentaje de lisis con la ratio iNKT:DCi 7,5:1; observándose diferencias significativas en las iDCs tratadas con lípidos polares (*, $p < 0,05$) y ácidos grasos libres (**, $p < 0,03$) respecto a las células control.

Respecto a la producción de IFN- γ e IL-4 por las células iNKT frente a las iDCs tratadas con los lípidos polares, no se observan cambios significativos en la producción de IL-4, pero se produce una disminución en la secreción de IFN- γ por parte de las iNKTs (Fig. 73).

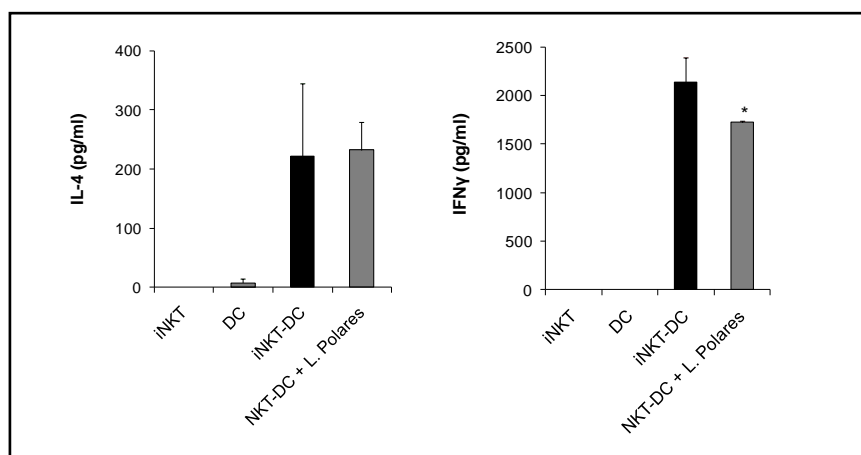


Figura 73. Detección de IFN- γ e IL-4 secretado por las células iNKT frente a DCi tratadas en ausencia y presencia de lípidos polares. Los

sobrenadantes fueron recogidos tras 48 h de cultivo y analizados por ELISA tipo sandwich. Se representa la media (pg/ml) \pm S.D. de tres experimentos independientes. Existen diferencias significativas en la secreción de IFN- γ entre las iDCs control y las tratadas con los lípidos polares (*, $p < 0,05$).

Por otro lado, se realizaron ensayos de proliferación de iNKTs a partir de PBMCs de donantes sanos. Al contrario de lo observado al tratar las células con el extracto total de lípidos del polen, no se obtuvo proliferación de células iNKT al tratar las PBMCs con la fracción de lípidos polares derivados del polen respecto a las PBMCs sin tratar (Fig. 74).

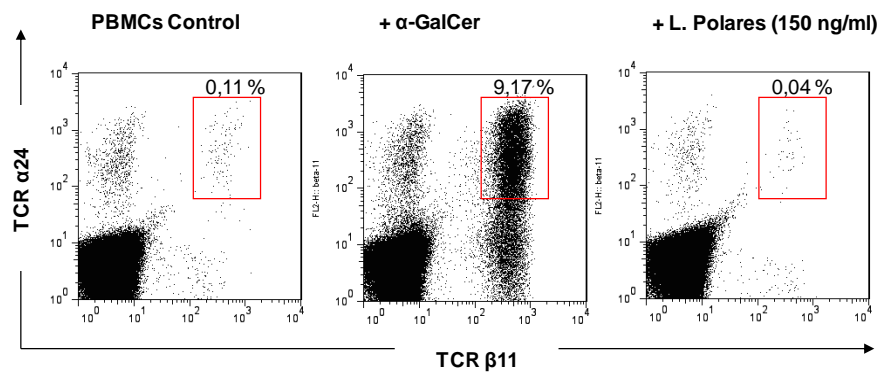


Figura 74. Porcentaje de proliferación de células iNKT marcadas con los anticuerpos anti-TCR $\alpha 24$ y anti-TCR $\beta 11$ en PBMCs estimuladas con lípidos polares del polen de olivo. Experimento representativo de siete donantes diferentes.

Nuestros resultados muestran un efecto citotóxico de las células iNKT frente a las DCs tratadas con la fracción de lípidos polares y de AG libres. Sin embargo, los lípidos polares no fueron capaces de aumentar la secreción de citoquinas ni de inducir proliferación de células iNKT de sangre periférica.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Lípidos totales del polen de olivo (*Olea europaea*) son capaces de activar células iNKT humanas de sangre periférica.

Los granos de polen son capaces de penetrar en el tracto respiratorio superior y contactar con las mucosas, liberando alérgenos en la fase acuosa y pudiendo producir reacciones alérgicas en algunos individuos. Se ha descrito que más de un 50% de las proteínas más alergénicas se encuentran asociadas a lípidos, por ejemplo, las proteínas transferidoras de lípidos (LTPs) presentes en frutas y pólenes (Thomas, Hales et al. 2005). Por otro lado, los lípidos se han considerado tradicionalmente como adyuvantes de las respuestas Th1 por la activación que producen a través del TLR-4. Sin embargo, se ha demostrado que el LPS y la activación del TLR-4 son necesarios para inducir hipersensibilidad de tipo Th2 en ratones y que la señal generada por MyD88, proteína adaptadora utilizada por los TLRs para activar al factor de transcripción NF- κ B, inicia la vía de señalización que induce respuestas Th2 en las DCs pulmonares (Piggott, Eisenbarth et al. 2005). Junto a estos y otros factores, hay que destacar el posible papel de las células iNKT, como células capaces de reconocer lípidos, en el desarrollo de las respuestas alérgicas.

Las células iNKT son capaces de secretar grandes cantidades de citoquinas tanto Th1 como Th2 al activarse. La exposición de estas células a ciertos alérgenos como el polen podría favorecer su activación y su posible actuación en las respuestas alérgicas. Además, las células iNKT han sido implicadas en el desarrollo de reacciones alérgicas en modelos experimentales de asma, demostrándose que los ratones deficientes en iNKTs no desarrollan hiperreactividad de las vías respiratorias ni eosinofilia (Takai, Kato et al. 2005) (Epelman, Stack et al. 2004). Asimismo, existen diversos estudios que muestran un aumento en el número de iNKTs en pacientes asmáticos (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009). Por todo ello, nos planteamos estudiar el reconocimiento de lípidos derivados de polen y su capacidad para estimular células iNKT.

Existen pocos estudios acerca del reconocimiento de lípidos procedentes de polen por linfocitos T específicos. Se ha descrito que PE y PC procedentes de polen de ciprés son capaces de inducir proliferación de células NKT en pacientes alérgicos. No obstante, la mayor parte de los clones proliferados restringidos por CD1d corresponden a células NKT de tipo II o no invariantes, y sólo uno de ellos a una línea de células iNKT, V α 24/V β 11. Esta línea era capaz de producir IL-4 e IFN- γ tras la estimulación *in vitro* con PE derivada del polen de ciprés (Agea, Russano et al. 2005).

En el presente trabajo, observamos proliferación (dosis-dependiente) de células iNKT en PBMCs tratadas con el extracto lipídico total de polen de olivo. Además del efecto proliferativo sobre las células iNKT, los lípidos del polen de olivo incrementaron la producción de IFN- γ e IL-4 en las PBMCs estimuladas. Aunque no se pudo descartar completamente la participación de otro tipo celular, el hecho de tratarse de un extracto lipídico apuntaba a las células iNKT como responsables de la secreción de IFN- γ e IL-4.

El efecto obtenido con el extracto total de lípidos de polen nos planteó dos posibles hipótesis:

1º. La existencia de un ligando lipídico presente en el polen de olivo reconocido específicamente por células iNKT.

2º. Un aumento en la expresión endógena de CD1d unido a co-estimulación a través de TLRs. Estos mecanismos coinciden con las posibles vías de activación descritas para células iNKT.

Nuestros resultados *in vitro* sugieren que a nivel fisiológico la activación y proliferación de células iNKT pulmonares podría desencadenarse, en algunos casos, por compuestos lipídicos de polen presentes en las mucosas. Este hecho podría explicar el aumento de células iNKT observado en pacientes asmáticos (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009).

2. Efecto de los extractos lipídicos procedentes del polen de olivo sobre monocitos, células dendríticas (DCs) y macrófagos (Mφ) derivados de monocitos y linfocitos B.

Habitualmente, se ha considerado que los granos de polen sólo penetran hasta el tracto respiratorio superior interaccionando con la mucosa nasal, pero existen evidencias de que un pequeño porcentaje de partículas grandes (entre 20 y 30 μm) pueden penetrar también en la periferia pulmonar (Driessen and Quanjer 1991). El tracto respiratorio tanto superior como inferior contiene macrófagos y DCs que juegan un papel crucial en la sensibilización de células T y en la respuesta inmune frente a alérgenos inhalados (Jahnsen, Moloney et al. 2001) (Bertorelli, Bocchino et al. 2000) (Agea, Forenza et al. 1998). Ambos tipos celulares tienen el potencial de expresar moléculas CD1, habiéndose demostrado un incremento de DCs CD1a⁺ y CD1d⁺ en el tracto respiratorio de individuos alérgicos (Agea, Forenza et al. 1998) (Spinozzi, Agea et al. 1998). Por ello, quisimos estudiar inicialmente la expresión de las moléculas CD1 frente al polen de olivo en células dendríticas derivadas de monocitos (DC) y macrófagos derivados de monocitos (Mφ).

En nuestro sistema *in vitro*, las DCs fueron capaces de interaccionar con los granos de polen en tan solo 15 minutos, quedando éstos totalmente englobados por la membrana plasmática de una o más células a las 2 horas de incubación. Sin embargo, a diferencia de los resultados de Agea et al. con granos de polen de ciprés (Agea, Russano et al. 2005), no observamos digestión de la pared externa. Esto no descartaría la posible interacción de las DCs con lípidos de la exina o de la cubierta polínica que rellena las cavidades de la exina, e incluso, que pequeños fragmentos o gránulos pudieran estar desprendiéndose y siendo endocitados o fagocitados por las células.

Estudios previos sugieren que receptores no específicos del tipo de las C-lectinas y de las integrinas se unen rápidamente a glicoproteínas de la superficie del polen induciendo la fagocitosis del grano de polen entero o bien de gránulos derivados del mismo (Grote 1999) (Currie, Stewart et al. 2000). Sin embargo, se ha publicado que las moléculas CD1d y CD1a pueden ser importantes en la interacción de DCs con granos de polen de ciprés, ya que dicha interacción podía ser bloqueada con anticuerpos anti-CD1d y en menor medida con anticuerpos anti-CD1a (Agea, Russano et al. 2005). Según estudios de microscopía electrónica, parece que PLs de la membrana del grano de polen (principalmente PS, PE, PC y cardiolipina) se disponen

en protuberancias cilíndricas hexagonales que no forman una estructura en bicapa (estos reordenamientos ocurren en un 40% de los lípidos de la membrana del polen). Las cadenas acilo de los PLs que quedan expuestas hacia el exterior podrían ser capaces de interactuar con la hendidura de la molécula CD1, estabilizando el contacto entre la DC y el grano de polen (Aguilar, Ortega-Pierres et al. 1999) (Bedinger, Hardeman et al. 1994). No obstante, no se aclara cómo es posible que estos lípidos del polen sean cargados en la molécula CD1d en ausencia de saposinas y otras enzimas presentes en endosomas, necesarias para el intercambio de lípidos.

Nuestros resultados mostraron un aumento en la expresión en membrana de CD1d en DCs en respuesta a los granos de polen de olivo. La fracción responsable del aumento de CD1d en superficie tanto en DCs como en M ϕ fue la fracción lipídica del polen; por el contrario, el extracto acuoso no indujo ningún cambio en la expresión de la molécula. Fisiológicamente, estos resultados pueden sugerir una posible activación inicial de células iNKT en la mucosa respiratoria inducida por el aumento endógeno de CD1d en DCs y M ϕ en respuesta al polen. Sin embargo, no se puede descartar la hipótesis del reconocimiento de un ligando específico entre los lípidos del polen por las células iNKT a través de CD1d.

El aumento de CD1d en la superficie celular y también a nivel de proteína total se correlacionó con un incremento significativo de RNA. Se ha descrito que el factor de transcripción PPAR- γ controla la expresión de CD1d mediante la activación de la síntesis de ácido retinoico all-trans (ATRA) en DCs humanas (Szatmari, Pap et al. 2006). El ATRA, derivado de la vitamina A, constituye un ligando para los receptores de ácido retinoico (RARs), que al ser activados inducen un aumento en la expresión de CD1d, al mismo tiempo que disminuyen la síntesis de CD1a en DCs. Efectivamente, nosotros observamos que las DCs tratadas con ATRA al igual que las tratadas con los lípidos del polen de olivo aumentaron la expresión de CD1d en superficie, al mismo tiempo que disminuyeron CD1a. Estos cambios se confirmaron a nivel transcripcional y apuntaban hacia una posible inducción de ATRA por activación de PPAR- γ en las DCs tratadas con los lípidos del polen.

En el caso de monocitos y M ϕ también se ha descrito el aumento en el RNAm de CD1d a través de receptores de ácido retinoico en células monocíticas humanas y murinas (Chen and Ross 2007). De acuerdo con estos datos, nosotros observamos que tanto el ATRA como los lípidos del polen, inducían aumento transcripcional de CD1d en monocitos y M ϕ . No obstante, no se apreció un aumento significativo de

CD1d en superficie en los monocitos tratados con ATRA ni con los lípidos de polen, lo que apuntaba o bien a que la proteína quedaba retenida intracelularmente o bien a que el RNAm de CD1d no era traducido. Los M ϕ al contrario que las DCs no sufrieron disminución significativa en la expresión en superficie de CD1a ni al ser tratados con ATRA ni con los lípidos del polen, sugiriendo la existencia de una vía de regulación distinta para CD1a en M ϕ (aunque no tenemos datos de expresión génica).

Por otra parte, se ha descrito que los linfocitos B aumentan la expresión de CD1c y CD1d en respuesta a la activación de RAR α (Allan, Stax et al. 2011). Nuestros experimentos en linfocitos B de sangre periférica mostraron un aumento ligero pero significativo en la expresión en superficie de CD1d por los lípidos del polen; y tanto CD1d como CD1c incrementaron su expresión en presencia de ATRA, confirmandose así los resultados obtenidos por Allan et al. El aumento en la expresión de CD1d al tratar los linfocitos B con los lípidos del polen fueron menores que en caso de las DCs y M ϕ , posiblemente por la menor capacidad de sintetizar ATRA de las células B. Sin embargo, a nivel fisiológico cabe la posibilidad de que ligandos de PPAR- γ derivados del polen puedan estimular DCs del microambiente con capacidad de generar mayores niveles de ATRA que influyan en el patrón de expresión de CD1d en las células B.

Por último, nuestros resultados acerca de la expresión de las moléculas CD1 en presencia de suero humano AB en lugar de suero de ternera fetal (FCS) corroboraron que las DCs también incrementan la expresión de CD1d frente a los lípidos del polen al ser cultivadas en suero humano. Los lípidos del polen de olivo podrían tener un efecto sinérgico con los lípidos del suero humano sobre la expresión de CD1d (lípidos del suero humano aumentan la expresión de CD1d por activación de PPAR- γ (Leslie, Dascher et al. 2008)). Sin embargo, a diferencia de las DCs cultivadas con FCS, la expresión de CD1a que era prácticamente nula en presencia de suero humano aumentó ligera pero significativamente. Este efecto quizá venga dado por la presencia de lípidos en el polen de olivo capaces de unirse a CD1a estabilizando la molécula en superficie. Se ha descrito que CD1a se estabiliza en superficie gracias a lípidos exógenos presentes en el suero, sin inducir síntesis *de novo* (Manolova, Kistowska et al. 2006). A pesar de que la activación de PPAR- γ por lípidos del suero humano provoca bajos niveles de expresión de CD1a, la presencia de lípidos exógenos procedentes del polen podría estabilizar estas moléculas en superficie.

3. El aumento en la expresión de CD1d inducido por los lípidos del polen de olivo es dependiente de la activación del factor de transcripción PPAR- γ .

Los receptores PPARs (PPAR α , γ y δ/β) son sensores de ácidos grasos que regulan diversas facetas del metabolismo lipídico. Sin embargo, estos factores de transcripción también se encuentran involucrados en diversas funciones del sistema inmune. Inicialmente, se detectó que las DCs derivadas de monocitos tenían una elevada expresión de PPAR- γ (Le Naour, Hohenkirk et al. 2001). Este descubrimiento es consistente con el hecho de que la IL-4 es un modulador positivo de PPAR- γ en monocitos y macrófagos murinos y humanos (Huang, Welch et al. 1999). Más adelante, se confirmó que tanto el RNAm como la proteína de PPAR- γ son inducidos en las DCs derivadas de monocitos (Szatmari and Nagy 2008). Por otra parte, al activar PPAR- γ en DCs inmaduras, éstas adquieren ciertas características funcionales: mayor actividad fagocítica, menor capacidad migratoria (Angeli, Hammad et al. 2003) y menor producción de IL-12, TNF- α e IL-6 y de las quimiocinas MCP2, IP-10 y RANTES. Aparece además, un patrón alterado en superficie de las moléculas co-estimuladoras, con altos niveles de CD86 y bajos niveles de CD80, CD83 y CD40; y como se mencionaba anteriormente mayores niveles en superficie de CD1d al mismo tiempo que una menor expresión de CD1a (Gosset, Charbonnier et al. 2001).

Nuestros resultados mostraron que las DCs tratadas con los lípidos del polen de olivo comparten algunas de las características descritas acerca de la activación de PPAR- γ . De esta forma, además del aumento en la expresión de CD1d y la disminución en CD1a, observamos que los lípidos indujeron un incremento en la expresión en superficie de CD86, sin modificar significativamente la expresión de CD80, HLA-DR ni HLA-I. Se ha descrito además que la expresión de CD86 aumenta en DCs tratadas con agonistas de PPAR- γ (Nencioni, Grunebach et al. 2002) (Szatmari, Gogolak et al. 2004). Junto a este patrón de expresión encontramos que los lípidos del polen tenían tendencia a disminuir, de forma dosis dependiente, la secreción de IL-12 por las DCs maduras en presencia de LPS. Todo ello en conjunto apuntaba a la activación de PPAR- γ .

Funcionalmente, ciertos estudios han relacionado la activación de PPAR- γ en DCs con una menor capacidad de activación de la respuesta Th1 y una mayor tendencia hacia la activación Th2 (Faveeuw, Fougeray et al. 2000). No obstante, otros trabajos han observado también una disminución en las citoquinas de tipo Th2,

sugiriendo que la activación de PPAR- γ reducía la inmunogenicidad de las DCs humanas en desarrollo (Nencioni, Grunebach et al. 2002).

Como se ha mencionado previamente, el factor de transcripción PPAR- γ controla la expresión de CD1d mediante la activación de la síntesis de las enzimas que transforman el retinol en ácido retinoico en DCs humanas. Por lo tanto, ligandos de PPAR- γ tanto sintéticos (rosiglitazona) como naturales (ácidos grasos, LDL oxidadas, prostaglandinas) pueden inducir la expresión de CD1d a través de ATRA. Nuestros experimentos con el inhibidor de PPAR- γ (GW9662) confirmaron que el aumento transcripcional de CD1d provocado por los lípidos del polen es causado por la activación de PPAR γ , de forma que el antagonista fue capaz de revertir el aumento en la expresión de CD1d provocado por los lípidos. Además, también se observó el mismo efecto a nivel de expresión en superficie, aunque la inhibición en la expresión de CD1d no fue total, apuntando a la existencia de algún otro factor no transcripcional responsable de dicho aumento. Por otro lado, el antagonista de PPAR γ sólo pudo restaurar parcialmente los niveles de expresión génica de CD1a en las células tratadas con los lípidos del polen, sugiriendo que esta disminución dependía también de algún otro factor distinto a la activación de PPAR γ . Es posible que la disminución en CD1a pueda estar producida por la presencia de bajos niveles de lipopolisacárido (LPS) entre los lípidos del polen. Se ha demostrado que el LPS inhibe la expresión de CD1a al tratar monocitos en diferenciación hacia DCs (Matsuda, Takeda et al. 2010).

Nuestros datos confirmaron que la expresión de CD1a disminuye significativamente tanto en superficie como a nivel transcripcional en DCs maduras con LPS sin ser este efecto dependiente de PPAR- γ . Además, el inhibidor de PPAR- γ tampoco consiguió disminuir totalmente la expresión en superficie de CD86 (marcador de maduración de DCs) inducida por los lípidos, hecho que favorece también la hipótesis del LPS.

En resumen, todos los datos apuntaron a que el aumento de CD1d producido por los lípidos del polen está regulado a nivel transcripcional por la activación de PPAR- γ . Los ácidos grasos (AG) presentes en los lípidos del polen destacan como posibles ligandos de activación de PPAR- γ puesto que existen diversos estudios que muestran una interacción directa entre AGs y eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) con el factor de transcripción PPAR- γ (Kliwer, Sundseth et al. 1997). En ellos se demuestra que AGs mono y poliinsaturados, incluidos el ácido linoleico, linolénico y el ácido araquidónico, son capaces de actuar como ligandos de

PPAR- γ . Por otra parte, el polen de olivo contiene un elevado porcentaje de estos AGs poliinsaturados en las cadenas acílicas de sus PLs, GLs y TGs. Estos datos favorecen la hipótesis de que los AGs presentes en los lípidos del polen de olivo activan PPAR- γ induciendo aumento de CD1d y CD86 y disminuyendo la expresión de las moléculas CD1 del grupo I.

4. Las células iNKT son capaces de responder frente a DCs tratadas con lípidos totales del polen de olivo.

Tras haber observado la activación de células iNKT en PBMCs de sangre periférica frente a los lípidos del polen y el aumento inducido en CD1d en DCs y M ϕ , quisimos estudiar la respuesta de células iNKT aisladas frente a DCs tratadas con los lípidos.

Previamente se había descrito que las DCs tratadas con agonistas de PPAR- γ (RSG) o con retinoides (ATRA) eran capaces de inducir una mayor proliferación y producción de IFN- γ en células iNKT autólogas, en presencia de α -GalCer (Szatmari, Pap et al. 2006) . En nuestros experimentos observamos que los lípidos del polen de olivo eran capaces de inducir proliferación de iNKTs a partir de PBMCs y aumentar la secreción de IL-4 e IFN- γ sin necesidad de añadir α -GalCer al cultivo. Además, las DCs tratadas con los lípidos del polen fueron capaces de incrementar la actividad citotóxica y la secreción de IL-4 e IFN- γ por las células iNKT aisladas. También se obtuvo aumento en la secreción de citoquinas y en el porcentaje de lisis al tratar las DCs con ATRA, siendo sorprendente el marcado aumento en la secreción de IL-4 e IFN- γ por las iNKTs.

Los resultados con ATRA sugerían que un aumento endógeno de la expresión de CD1d era capaz de provocar activación de las células iNKT. Es decir, el aumento en la expresión de CD1d unido a ligandos endógenos o ligandos presentes en el FCS era capaz de inducir una fuerte respuesta en las iNKTs. Sin embargo, a diferencia del ATRA, la activación inducida por los lípidos del polen podía deberse también al posible reconocimiento de un ligando entre los lípidos del polen. Para intentar solventar esta incógnita, tratamos la línea transfectante CD1d.221 con los lípidos del polen y la enfrentamos con células iNKT para evaluar su actividad citotóxica. Los resultados no mostraron un aumento significativo en el porcentaje de lisis respecto a las células control, apuntando a la no existencia de un antígeno lipídico específico en el polen de

olivo. No obstante, aún cabía la posibilidad de un posible procesamiento lipídico realizado por la maquinaria enzimática de las DCs, que no se estuviera realizando en la línea linfoblastoide CD1d.221. Por otra parte, encontramos que el inhibidor de PPAR- γ fue capaz de disminuir la lisis inducida por los lípidos del polen en DCs, indicando que el efecto citotóxico de las iNKTs estaba provocado por la activación de PPAR- γ y el consiguiente aumento endógeno de CD1d. Sin embargo, este hecho tampoco era contradictorio con un posible procesamiento enzimático y presentación de lípidos del polen que pudieran favorecer la estabilización de CD1d en la superficie celular.

Ni nosotros ni otros grupos hemos observado activación de células iNKT frente a DCs tratadas con RSG en ausencia de α -GalCer. Sin embargo, si el mecanismo por el cual se induce respuesta en las iNKTs con los lípidos del polen es dependiente de la activación de PPAR- γ , ¿por qué no ocurre lo mismo con las DCs tratadas con RSG? Por un lado, podría ser debido a la existencia de co-estimulación a través de TLRs, por componentes como el LPS presentes entre los lípidos del polen que amplifiquen la activación de las células iNKT. Por otra parte, hay que destacar que en nuestros experimentos obtuvimos una mayor expresión en superficie de CD1d en las DCs estimuladas con los lípidos del polen en comparación con la RSG. Esto podría ser por:

1º. Una mejor captación de los lípidos del polen por las DCs.

2º. Una mayor eficiencia en la activación de PPAR- γ por los compuestos lipídicos del polen.

3º. Efecto de estabilización de CD1d en la membrana citoplasmática por los lípidos del polen.

En relación a la 1ª hipótesis, se sabe que los AGs de cadena larga pueden difundir rápidamente a través de las bicapas lipídicas; existiendo también un transporte facilitado por proteínas integrales o asociadas a membrana. Por ejemplo, la proteína CD36, de la familia de receptores scavenger, se expresa entre otros tipos celulares en monocitos, macrófagos y DCs (Xiong and Abumrad 2009). Los receptores CD36, son capaces de unir distintos ligandos, entre ellos AG de cadena larga, PLs oxidados, lipoproteínas o LDL oxidadas. En macrófagos se ha descrito que CD36 puede captar LDL oxidadas y células apoptóticas y, además, su expresión está regulada positivamente por PPAR- γ (Huang, Welch et al. 1999). Es posible que ciertos

componentes de los lípidos del polen del olivo, como PLs y AGs, puedan tener un transporte facilitado por CD36 al interior celular, lo que les permita ejercer una acción más rápida y eficiente.

5. Activación de las células iNKT frente a lípidos de polen: influencia en alergia y asma.

Puesto que se había involucrado a las células iNKT tanto en la patogenia de la AHR murina como del asma en humanos, uno de los principales objetivos de este trabajo era comprobar si las células iNKT podían favorecer una respuesta Th1 o Th2 *in vitro* frente a los lípidos de polen. Nuestros resultados mostraron que las iNKTs inducen un aumento tanto de IFN- γ como de IL-4 al ser cultivadas en presencia de DCs tratadas con lípidos del polen de olivo. Al mismo tiempo, se observó un incremento en la producción de IL-12 en presencia de células iNKT. Esto contrastaba con la disminución observada al tratar las DCs con LPS y lípidos del polen en ausencia de iNKTs. Sin embargo, ambos resultados no tienen por qué excluirse mutuamente, ya que las células iNKT son capaces de inducir marcadores de maduración en DCs (CD83, CD86 y HLA-DR) y de estimular la secreción de IL-12 (Vincent, Leslie et al. 2002). De este modo, el aumento en la expresión endógena de CD1d por los lípidos del polen podía estar amplificando la secreción de IL-12 por las DCs a través de la activación de las células iNKT.

En resumen, este estudio muestra la capacidad potencial de las células iNKT para activarse y producir citoquinas tanto Th1 como Th2 al encontrarse con componentes lipídicos del polen en el tracto respiratorio. No obstante, es importante aclarar que nuestro sistema no tiene en cuenta la influencia de otros tipos celulares que en condiciones fisiológicas pueden estar implicados en la patogénesis de las respuestas respiratorias alérgicas. Se ha descrito que las células iNKT pueden ser activadas por IL-25 secretada por células epiteliales, aumentando la respuesta Th2 en los pulmones de pacientes con asma (Letuve, Lajoie-Kadoch et al. 2006) (Owyang, Zaph et al. 2006). La IL-33, también secretada por células epiteliales es capaz de aumentar la producción de citoquinas Th1 y Th2 en células NKT activadas (Smithgall, Comeau et al. 2008). Asimismo, las células iNKT expresan el receptor para la linfoproteína estromal tímica (TSLP) (producida por células epiteliales) que puede inducir secreción de IL-13 y aumentar la respuesta inflamatoria de las vías aéreas

(Nagata, Kamijuku et al. 2007). Todas estas interacciones pueden influir en la respuesta de las células iNKT *in vivo*.

Además de los lípidos procedentes del polen, otros estudios han mostrado que sustancias presentes en el medio ambiente (contaminantes, polvo, bacterias y virus) pueden activar células iNKT y empeorar las respuestas alérgicas inflamatorias (Pichavant, Goya et al. 2008) (Kim, Battaile et al. 2008). Por ejemplo, glicolípidos procedentes de la pared celular de *Esfingomonas* pueden inducir AHR rápidamente tras su administración por vía respiratoria en ratones silvestres, pero no en ratones deficientes en iNKTs (Meyer, Goya et al. 2006). Las células iNKT son necesarias para el desarrollo de asma inducido por ozono mediante la secreción de IL-17 en el pulmón de ratón (Pichavant, Goya et al. 2008). En infecciones virales las iNKTs son capaces además, de activar la secreción de IL-13 por macrófagos induciendo AHR (Kim, Battaile et al. 2008). Recientemente (Wingender, Rogers et al. 2011) se ha descrito que la mayoría de los extractos de polvo domésticos contienen antígenos capaces de activar tanto hibridomas de células iNKT V α 14, como líneas celulares humanas V α 24. Al administrar el extracto de polvo doméstico junto con OVA se producía un aumento en la producción de citoquinas en los pulmones de los ratones por parte de las células iNKT y de las células CD4⁺, mostrando un efecto sinérgico de ambos tipos celulares en la secreción de citoquinas tanto Th2 como de IL-17A.

Hay que considerar que aunque las células Th1 pueden disminuir los efectos de la respuesta Th2 en procesos alérgicos, también se ha observado que la respuesta inflamatoria Th1 y otros factores independientes a la respuesta Th2 pueden agravar su patogenia (Hansen, Berry et al. 1999). Por ejemplo, se ha observado que el IFN- γ está presente a menudo en los focos de inflamación alérgica y se piensa que contribuye a la patogénesis. Además, la IL-17 y los neutrófilos también pueden contribuir a la patogénesis del asma severo y del asma resistente a esteroides (Al-Ramli, Prefontaine et al. 2009) (McKinley, Alcorn et al. 2008). Por otra parte, aunque la transferencia de células Th1 específicas de alérgeno en los pulmones de ratón no induce directamente AHR, aumenta la inflamación de las vías aéreas. Es decir, las células iNKT en un entorno alérgico inflamatorio pueden secretar citoquinas Th2 mediante la interacción con otros tipos celulares; o bien, desencadenar fenómenos inflamatorios por vías independientes a la respuesta Th2 como se ha visto en estos estudios.

6. Efecto de los distintos componentes lipídicos del polen de olivo sobre las DCs y sobre la activación de células iNKT.

Una vez estudiado el efecto de la fracción lipídica total del polen de olivo, pasamos a separar sus componentes por cromatografía en capa fina (TLC), con el fin de identificar las especies responsables del aumento en la expresión de CD1d y de la activación de células iNKT.

La composición lipídica del polen de olivo ha sido muy bien caracterizada (Rodríguez-Rosales and Donaire 1988), destacando como los compuestos predominantes: PC (28,9% del total de lípidos), AG libres (23,1%), TGs (17%) y DGs (14,7%); y en menor cantidad: PE (5,1%), MG (4,9%), GL (2,6%), PI (2,2%) y PA (1,5%).

Cada una de las fracciones lipídicas aisladas del polen de olivo (lípidos polares, DGs, AGs libres y TGs) indujo aumento de expresión de CD1d en superficie en las DCs. Sin embargo, las especies que produjeron un mayor incremento de CD1d dosis-dependiente fueron la fracción polar y la de AGs. Hay que destacar que de todas ellas solamente los AGs libres mostraron una tendencia a disminuir CD1a (no significativa). Por otro lado, los resultados de q-PCR a tiempo real mostraron un aumento significativo en la expresión génica de CD1d en las DCs tratadas con la fracción de AGs y una tendencia hacia valores menores de CD1a, lo que apoyaría la hipótesis de que son éstos los responsables del efecto observado con los lípidos totales. Sin embargo, el aumento en la expresión génica de CD1d no fue tan alto como en el caso de la fracción total de lípidos. Esto podía ser debido a la menor cantidad de AGs en comparación con la cantidad presente en la fracción de lípidos totales. Hay que tener en cuenta que las especies lipídicas del polen (PLs, DGs y TGs) presentan en su estructura cadenas de AG que, al ser procesadas por la maquinaria enzimática de la célula (fosfolipasas, lipasas), constituirían una fuente adicional de AGs en el interior de las DCs con capacidad potencial de unirse y activar al factor de transcripción PPAR- γ .

La fracción de lípidos polares (PLs y GLs) indujo aumento en superficie de CD1d pero no a nivel transcripcional. Este hecho era consistente con la incapacidad del inhibidor de PPAR- γ para disminuir la expresión en superficie de la molécula en las células tratadas con la fracción polar. Tampoco con los lípidos totales se inhibía totalmente la expresión de CD1d en superficie. En consecuencia, este incremento podía estar producido por cambios en la distribución intracelular de CD1d, de forma

que la proteína se estabilizara en superficie al unirse a estos ligandos polares. Los lípidos exógenos pueden fusionarse con la membrana plasmática, alcanzar endosomas y reciclarse hacia la superficie celular, o bien dirigirse hacia otros orgánulos como endosomas tardíos y lisosomas o hacia el RE o el Golgi (De Libero and Mori 2010). En todas estas localizaciones los lípidos polares pueden unirse a moléculas CD1d, incrementando su expresión en superficie. No obstante, los resultados del marcaje intracelular mostraron que al igual que con el ATRA y la fracción total de lípidos, los lípidos polares incrementaban la cantidad de CD1d total respecto a las células control, es decir, existía síntesis *de novo*.

Otros estudios han descrito mecanismos de aumento de expresión de CD1d distintos al transcripcional; por ejemplo, el aumento en la expresión de CD1d en DCs infectadas con la bacteria *Listeria monocytogenes* era inducido por IFN- β a través de un mecanismo de síntesis *de novo*, postranscripcional (Raghuraman, Geng et al. 2006). Por otro lado, algunos trabajos habían observado la inhibición en la expresión de CD1d ante distintos agentes infecciosos por aumento en la ubiquitinización de la molécula y posterior endocitosis y/o degradación de la proteína por el proteasoma o por proteasas (Sanchez, Gumperz et al. 2005) (Yuan, Dasgupta et al. 2006) (Kawana, Quayle et al. 2007) (Miura, Kawana et al. 2010). En nuestro caso se podía pensar en una posible inhibición de la ubiquitinización que indujera una menor degradación de CD1d, incrementando su expresión en superficie.

Al tratar DCs con el sobrenadante de dichas células cultivadas en presencia de los lípidos polares, no observamos ningún cambio en la expresión de CD1d respecto al control. Por consiguiente se descartó la hipótesis de la existencia de un factor soluble secretado al medio, como en el caso del IFN- β mencionado anteriormente. Por otro lado, si estos lípidos estuvieran bloqueando la vía de degradación de CD1d por el proteasoma a través de la inhibición en la ubiquitinización, al tratar con inhibidores del proteasoma observaríamos algún aumento en la expresión de CD1d. Sin embargo, las DCs tratadas con el inhibidor reversible del proteasoma, MG132, no sufrieron ninguna modificación en la expresión de CD1d; es decir, no hubo un mayor aumento en superficie, ni en las células control ni en las tratadas con los lípidos polares. Esto sugería que el aumento en la expresión de CD1d no era debido a la inhibición de la degradación de la molécula por el proteasoma, lo que no significaba que no pudieran estar bloqueadas otras vías de degradación por proteasas. Es decir, los resultados no apuntaban a ningún factor secretado al medio ni a la inhibición en la degradación de la

molécula como responsables del incremento en la expresión de CD1d por los lípidos polares, pero debía tratarse de un mecanismo postranscripcional.

Al fraccionar los lípidos polares mediante TLC bidimensional se obtuvieron cuatro especies principales. Todas las fracciones aisladas incrementaron la expresión de CD1d en las DCs, pero hubo una (PL4) que indujo un aumento drástico en la expresión en superficie de CD1d, observándose dicho incremento en todos los individuos examinados y siempre con altos niveles de expresión. También se observó este incremento en monocitos, pero no en células B. Además, los resultados por q-PCR confirmaron que el aumento no se producía a nivel transcripcional. Respecto a la identidad de esta fracción lipídica, los datos sobre la composición del polen de olivo (Rodríguez-Rosales and Donaire 1988) y las referencias acerca de la migración relativa en la separación por TLC bi-dimensional, apuntaban a que esta especie pudiera ser PI. Sin embargo, al estudiar el efecto sobre la expresión de CD1d en DCs de distintos fosfatidilinosínticos sintéticos y purificados, no se observó ningún aumento en la expresión de CD1d, señalando que dicho efecto no era generado por cualquier especie fosfolipídica sino que era específico de las especies derivadas del polen.

En cuanto a los experimentos de activación de células iNKT con las fracciones lipídicas extraídas por cromatografía se observó por un lado, un aumento significativo en el porcentaje de lisis de las DCs tratadas con la fracción de AG y con la fracción de lípidos polares por las iNKTs, pero no con la fracción de TG. Esto coincidía con la mayor expresión en superficie de CD1d inducida por la fracción polar y de AGs. No obstante, no se produjo ningún aumento en la secreción de IFN- γ ni de IL-4 por las células iNKT al enfrentarlas con DCs tratadas con lípidos polares.

Los resultados descritos acerca del reconocimiento de PLs y activación de células iNKT humanas no son muy amplios. Agea et al., mostraron un clon de iNKTs que aumentaba la producción de IFN- γ e IL-4 frente a PE de polen de ciprés y frente a PE 18:2/18:2 sintética en un sujeto alérgico. También se ha descrito que la lisofosfatidilcolina (LPC), lípido pro-inflamatorio generado por la acción de la fosfolipasa A2 (PLA2), es capaz de aumentar la secreción de citoquinas por las células iNKT. Asimismo, la lisoesfingomielina, que comparte la misma cabeza polar que la LPC, activa células iNKT. Sin embargo, la PC y el PI (con la misma cadena acílica que la LPC, 18:1/18:1) sólo inducen un pequeño o nulo aumento en la secreción de citoquinas por los distintos clones de iNKTs. Así pues, tampoco los PLs procedentes

del polen de olivo indujeron un aumento en la secreción de citoquinas por las células iNKT.

Se ha identificado que la PLA2 residente en lisosomas aumenta su expresión en células monocíticas humanas tras la estimulación a través del receptor retinoide X (RXR), sugiriendo que la LPC puede producirse en algunos tipos de activación celular (Fox L.M., D.G. Cox et al. 2009). Una posible hipótesis apuntaría hacia el aumento en la expresión de la PLA2 al tratar las DCs con los lípidos totales del polen, a través de los receptores de retinoides, produciéndose un aumento en la síntesis de LPC a partir de PC, presente en un alto porcentaje entre los lípidos del polen de olivo (28,9%). El incremento en la presentación de LPC a células iNKT unido al aumento endógeno de CD1d podría estar favoreciendo la mayor secreción de citoquinas observada en nuestros experimentos con los lípidos totales del polen. Esto podría explicar que la fracción de lípidos totales del polen de olivo sea capaz de inducir secreción de citoquinas por las células iNKT, y por el contrario, los PLs aislados no produzcan este efecto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células iNKT humanas de sangre de donantes sanos son capaces de proliferar y activarse frente a lípidos del polen de olivo.
2. Las células dendríticas derivadas de monocitos son capaces de interactuar con granos de polen de olivo, madurar y aumentar la expresión en superficie de CD1d.
3. Células dendríticas, macrófagos derivados de monocitos y células B de sangre periférica aumentan la expresión en membrana de CD1d en respuesta a los lípidos del polen de olivo.
4. El aumento en la expresión de CD1d en células dendríticas, macrófagos y monocitos inducido por los lípidos totales del polen de olivo se produce a nivel transcripcional. Éste aumento es dependiente de PPAR γ en células dendríticas.
5. Los lípidos polares y los ácidos grasos libres del polen de olivo son las fracciones que producen un incremento mayor en la expresión en superficie de CD1d en células dendríticas. El aumento inducido por los lípidos polares no se produce a nivel transcripcional.
6. Las células iNKT responden a las células dendríticas tratadas con lípidos de polen de olivo, mediante citolisis y producción de IFN- γ e IL-4.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAM ϕ - Macrófago activado por la vía alternativa.

AG - Ácido graso

AHR - *Airway hyperreactivity*. Hiperreactividad de las vías respiratorias.

ATRA - *All Trans-Retinoic Acid*. Ácido retinoico all-trans.

APC - *Antigen Presenting Cells*. Células presentadoras de antígeno.

α -GalCer - Alfa-Galactosilceramida.

BAL - *Bronchoalveolar Lavage*. Lavado broncoalveolar.

β -GalCer - Beta-Galactosilceramida.

β -GlcCer - β -d-Glucopiranosilceramida.

CAM ϕ - Macrófago activado por la vía clásica.

COPD – *Chronic obstructive pulmonar disease*. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

DDM - Didehidroximicobactin.

DG - Diacilglicerol.

GAPDH - *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*.

GL - Glucolípido.

GM-CSF - *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

GPI - Glycosylphosphatidyl Inositol.

GSL - *Glycosphingolipids*.

iDC - *Immature Dendritic Cell*.

IFN - Interferon.

iNKT - *Invariant Natural Killer T*.

iGb3 - Isoglobotrihexosilceramida.

LDH - Lactato Deshidrogenasa.

LPS - Lipopolisacarido.

LPG - Lipofosfoglicano.

LTP - *Lipid transfer protein*. Proteína transferidora de lípidos.

M ϕ - Macrófago.

mDC - *Mature dendritic cell*.

MIIC - *MHC class II compartment*.

MFI - Intensidad media de Fluorescencia.

MG - Monoacilglicerol.

MTTP - *Microsomal triglyceride transfer protein*. Proteína microsomal transferidora de triglicéridos.

NK - *Natural Killer*.

OVA – Ovoalbúmina.

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns*. Patrones moleculares asociados a patógenos

PBLs – *Peripheral blood lymphocytes*. Linfocitos de sangre periférica.

PBMCs - *Peripheral blood mononuclear cells*. Células mononucleares de sangre periférica.

PC - *Phosphatidylcholine*.

PE - *Phosphatidylethanolamine*.

PG - *Phosphatidylglycerol*.

PI - *Phosphatidylinositol*.

PIM – *Phosphatidylinositol manoxide*.

PL - *Phospholipids*.

PPAR γ - *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ* . Factor de transcripción de genes relacionados con la captura, acumulación y almacenamiento de lípidos.

RAR - Receptor de ácido retinoico.

RSG - Rosiglitazona. Análogo de PPAR γ .

RT-PCR - *Real Time-Polimerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

TCR - *T cell receptor*. Receptor para antígeno de la célula T.

TG - Triacilglicerol.

TLC - Thin Layer Chromatography. Cromatografía en capa fina.

TLR – *Toll-like receptor*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA**A**

- Agea, E., N. Forenza, et al. (1998). "Expression of B7 co-stimulatory molecules and CD1a antigen by alveolar macrophages in allergic bronchial asthma." Clin Exp Allergy **28**(11): 1359-67.
- Agea, E., A. Russano, et al. (2005). "Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens." J Exp Med **202**(2): 295-308.
- Aguilar, L., G. Ortega-Pierres, et al. (1999). "Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic." J Biol Chem **274**(36): 25193-6.
- Akbari, O., J. L. Faul, et al. (2006). "CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma." N Engl J Med **354**(11): 1117-29.
- Akbari, O., P. Stock, et al. (2003). "Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity." Nat Med **9**(5): 582-8.
- Akira, S. (2003). "Mammalian Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **15**(1): 5-11.
- Al-Ramli, W., D. Prefontaine, et al. (2009). "T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1185-7.
- Allan, L. L., A. M. Stax, et al. (2011). "CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling." J Immunol **186**(9): 5261-72.
- Allende, M. L., D. Zhou, et al. (2008). "S1P1 receptor expression regulates emergence of NKT cells in peripheral tissues." Faseb J **22**(1): 307-15.
- Amprey, J. L., J. S. Im, et al. (2004). "A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1d-bound lipophosphoglycan." J Exp Med **200**(7): 895-904.
- Amprey, J. L., G. F. Spath, et al. (2004). "Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with Leishmania donovani." Infect Immun **72**(1): 589-92.

- Angeli, V., H. Hammad, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response." J Immunol **170**(10): 5295-301.
- Angenieux, C., V. Fraissier, et al. (2005). "The cellular pathway of CD1e in immature and maturing dendritic cells." Traffic **6**(4): 286-302.
- Ashkar, A. A. and K. L. Rosenthal (2003). "Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection." J Virol **77**(18): 10168-71.

B

- Balk, S. P., P. A. Bleicher, et al. (1991). "Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1." J Immunol **146**(2): 768-74.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Beckman, E. M., S. A. Porcelli, et al. (1994). "Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells." Nature **372**(6507): 691-4.
- Bedinger, P. A., K. J. Hardeman, et al. (1994). "Travelling in style: the cell biology of pollen." Trends Cell Biol **4**(4): 132-8.
- Bendelac, A., M. Bonneville, et al. (2001). "Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes." Nat Rev Immunol **1**(3): 177-86.
- Bendelac, A., P. B. Savage, et al. (2007). "The biology of NKT cells." Annu Rev Immunol **25**: 297-336.
- Bertorelli, G., V. Bocchino, et al. (2000). "Dendritic cell number is related to IL-4 expression in the airways of atopic asthmatic subjects." Allergy **55**(5): 449-54.
- Berzins, S. P., M. J. Smyth, et al. (2011). "Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 131-42.
- Blewwet, M. M. (2010). "Lipid autorreactivity in multiple sclerosis." Med Hypotheses **74**(3): 433-42.
- Blumberg, R. S., C. Terhorst, et al. (1991). "Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells." J Immunol **147**(8): 2518-24.

- Bradbury, A., K. T. Belt, et al. (1988). "Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus." Embo J **7**(10): 3081-6.
- Bratke, K., P. Julius, et al. (2007). "Invariant natural killer T cells in obstructive pulmonary diseases." N Engl J Med **357**(2): 194; author reply 194-5.
- Brennan, P. J., R. V. Tatituri, et al. (2011). "Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals." Nat Immunol **12**(12): 1202-11.
- Bricard, G. and S. A. Porcelli (2007). "Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity." Cell Mol Life Sci **64**(14): 1824-40.
- Brigl, M. and M. B. Brenner (2004). "CD1: antigen presentation and T cell function." Annu Rev Immunol **22**: 817-90.
- Brigl, M., L. Bry, et al. (2003). "Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection." Nat Immunol **4**(12): 1230-7.
- Briken, V., R. M. Jackman, et al. (2002). "Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules." Embo J **21**(4): 825-34.
- Briken, V., R. M. Jackman, et al. (2000). "Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens." J Exp Med **192**(2): 281-8.
- Brossay, L., D. Jullien, et al. (1997). "Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells." J Immunol **159**(3): 1216-24.
- Brozovic, S., T. Nagaishi, et al. (2004). "CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein." Nat Med **10**(5): 535-9.
- Brutkiewicz, R. R. and V. Sriram (2002). "Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity." Crit Rev Oncol Hematol **41**(3): 287-98.
- Bukowski, J. F., C. T. Morita, et al. (1999). "Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity." Immunity **11**(1): 57-65.

C

- Calabi, F., K. T. Belt, et al. (1989). "The rabbit CD1 and the evolutionary conservation of the CD1 gene family." Immunogenetics **30**(5): 370-7.

- Calabi, F., J. M. Jarvis, et al. (1989). "Two classes of CD1 genes." Eur J Immunol **19**(2): 285-92.
- Canchis, P. W., A. K. Bhan, et al. (1993). "Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d." Immunology **80**(4): 561-5.
- Cattoretti, G., E. Berti, et al (1987). "An MHC class I related family of antigens with widespread distribution on resting and activated cells." Leukocyte Typing III ed. AJ McMichael 89-91.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, et al. (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." Nature **360**(6401): 258-61.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.
- Cernadas, M., M. Sugita, et al. (2003). "Lysosomal localization of murine CD1d mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development." J Immunol **171**(8): 4149-55.
- Chang, Y.J., H.Y. Kim, et al. (2011). "Influenza infection in suckling mice expands an NKT cell subset that protects against airway hyperreactivity." J Clin Invest **121**:57-69.
- Chapuis, F., M. Rosenzweig, et al. (1997). "Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro". Eur J Immunol **27**:431-441-
- Colgan, S. P., V. M. Morales, et al. (1996). "IFN-gamma modulates CD1d surface expression on intestinal epithelia." Am J Physiol **271**(1 Pt 1): C276-83.
- Coquet, J. M., K. Kyparissoudis, et al. (2007). "IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production." J Immunol **178**(5): 2827-34.
- Currie, A. J., G. A. Stewart, et al. (2000). "Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease." J Immunol **164**(7): 3878-86.
- Chan, O. T., V. Paliwal, et al. (2001). "Deficiency in beta(2)-microglobulin, but not CD1, accelerates spontaneous lupus skin disease while inhibiting nephritis in MRL-

Fas(lpr) mice: an example of disease regulation at the organ level." J Immunol **167**(5): 2985-90.

Chen, N., C. McCarthy, et al. (2006). "HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef." Eur J Immunol **36**(2): 278-86.

Chen, Q. and A. C. Ross (2007). "Retinoic acid regulates CD1d gene expression at the transcriptional level in human and rodent monocytic cells." Exp Biol Med (Maywood) **232**(4): 488-94.

Chung, Y., R. Nurieva, et al. (2008). "A critical role of costimulation during intrathymic development of invariant NK T cells." J Immunol **180**(4): 2276-83.

D

Das, J., P. Eynott, et al. (2006). "Natural killer T cells and CD8+ T cells are dispensable for T cell-dependent allergic airway inflammation." Nat Med **12**(12): 1345-6; author reply 1347.

De Libero, G. and L. Mori (2010). "How the immune system detects lipid antigens." Prog Lipid Res **49**(2): 120-7.

De Silva, A. D., J. J. Park, et al. (2002). "Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum." J Immunol **168**(2): 723-33.

Dougan, S. K., A. Salas, et al. (2005). "Microsomal triglyceride transfer protein lipidation and control of CD1d on antigen-presenting cells." J Exp Med **202**(4): 529-39.

Driessen, M. N. and P. H. Quanjer (1991). "Pollen deposition in intrathoracic airways." Eur Respir J **4**(3): 359-63.

Duperrier, K., A. Eljaafari, et al. (2000). "Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements." J Immunol Methods **238**(1-2): 119-31.

E

- Eberl, G., R. Lees, et al. (1999). "Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells." J Immunol **162**(11): 6410-9.
- Edlund, A. F., R. Swanson, et al. (2004). "Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination." Plant Cell **16 Suppl**: S84-97.
- Elewaut, D., A. P. Lawton, et al. (2003). "The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells." J Exp Med **198**(8): 1133-46.
- Epelman, S., D. Stack, et al. (2004). "Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs." J Immunol **173**(3): 2031-40.
- Exley, M., J. Garcia, et al. (2000). "CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes." Immunology **100**(1): 37-47.

F

- Faveeuw, C., S. Fougeray, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells." FEBS Lett **486**(3): 261-6.
- Fischer, K., E. Scotet, et al. (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10685-90.
- Forman, B.M., P. Tontonoz, et al. (1995). "15-Deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." Cell **83**(5): 803-812.
- Fox, L.M., D.G. Cox, et al (2009). "Recognition of lyso-phospholipids by human Natural Killer lymphocytes." PLoS Biol **7**(10): e1000228.
- Franki, A. S., K. Van Beneden, et al. (2006). "A unique lymphotoxin {alpha}beta-dependent pathway regulates thymic emigration of V{alpha}14 invariant natural killer T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9160-5.
- Fujii, S., K. Shimizu, et al. (2003). "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo

and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein." J Exp Med **198**(2): 267-79.

G

Gadola, S. D., N. R. Zaccai, et al. (2002). "Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains." Nat Immunol **3**(8): 721-6.

Galli, G., P. Pittoni, et al. (2007). "Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3984-9.

Gansert, J. L., V. Kiessler, et al. (2003). "Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity." J Immunol **170**(6): 3154-61.

Geissmann, F., T. O. Cameron, et al. (2005). "Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids." PLoS Biol **3**(4): e113.

Gerlini, G., H. P. Hefti, et al. (2001). "Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells." J Invest Dermatol **117**(3): 576-82.

Gerlini, G., A. Tun-Kyi, et al. (2004). "Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions." Am J Pathol **165**(6): 1853-63.

Giabbai, B., S. Sidobre, et al. (2005). "Crystal structure of mouse CD1d bound to the self ligand phosphatidylcholine: a molecular basis for NKT cell activation." J Immunol **175**(2): 977-84.

Giaccone, G., C. J. Punt, et al. (2002). "A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors." Clin Cancer Res **8**(12): 3702-9.

Gilleron, M., S. Stenger, et al. (2004). "Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*." J Exp Med **199**(5): 649-59.

Godfrey, D. I. and S. P. Berzins (2007). "Control points in NKT-cell development." Nat Rev Immunol **7**(7): 505-18.

Godfrey, D. I. and M. Kronenberg (2004). "Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells." J Clin Invest **114**(10): 1379-88.

- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, et al. (2004). "NKT cells: what's in a name?" Nat Rev Immunol **4**(3): 231-7.
- Godfrey, D. I., D. G. Pellicci, et al. (2010). "Antigen recognition by CD1d-restricted NKT cell receptors." Semin Immunol **22**(2): 61-7.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., L. Van Kaer, et al. (2002). "Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines." J Exp Med **195**(5): 617-24.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-30.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Gosset, P., A. S. Charbonnier, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **31**(10): 2857-65.
- Grote, M. (1999). "In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites." Int Arch Allergy Immunol **118**(1): 1-6.
- Grubor-Bauk, B., A. Simmons, et al. (2003). "Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR." J Immunol **170**(3): 1430-4.
- Gumperz, J. E., S. Miyake, et al. (2002). "Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining." J Exp Med **195**(5): 625-36.
- Gumperz, J. E., C. Roy, et al. (2000). "Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids." Immunity **12**(2): 211-21.

H

- Hachem, P., M. Lisbonne, et al. (2005). "Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma." Eur J Immunol **35**(10): 2793-802.
- Hamzaoui, A., S. Cheik Rouhou, et al. (2006). "NKT cells in the induced sputum of severe asthmatics." Mediators Inflamm **2006**(2): 71214.

- Hansen, G., G. Berry, et al. (1999). "Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation." J Clin Invest **103**(2): 175-83.
- Hava, D. L., M. Brigl, et al. (2005). "CD1 assembly and the formation of CD1-antigen complexes." Curr Opin Immunol **17**(1): 88-94.
- Hayakawa, Y., D. I. Godfrey, et al. (2004). "Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application." Curr Med Chem **11**(2): 241-52.
- Heller, F., I. J. Fuss, et al. (2002). "Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells." Immunity **17**(5): 629-38.
- Hopkins, J. and B. M. Dutia (1991). "Workshop studies on the ovine CD1 homologue." Vet Immunol Immunopathol **27**(1-3): 97-9.
- Hou, W. S. and L. Van Parijs (2004). "A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells." Nat Immunol **5**(6): 583-9.
- Huang, J. T., J. S. Welch, et al. (1999). "Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase." Nature **400**(6742): 378-82.
- Hunger, R. E., P. A. Sieling, et al. (2004). "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." J Clin Invest **113**(5): 701-8.
- Huttinger, R., G. Staffler, et al. (1999). "Analysis of the early biogenesis of CD1b: involvement of the chaperones calnexin and calreticulin, the proteasome and beta(2)-microglobulin." Int Immunol **11**(10): 1615-23.
- I**
- Ichimiya, S., A. Matsuura, et al. (1993). "Molecular cloning of a cDNA encoding the rat homologue of CD1." Transplant Proc **25**(5): 2773-4.
- Ishihara, S., M. Nieda, et al. (1999). "CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver." Eur J Immunol **29**(8): 2406-13.
- Iwamura, C. and T. Nakayama (2010). "Role of NKT cells in allergic asthma." Curr Opin Immunol **22**(6):807-813.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.

J

Jahng, A., I. Maricic, et al. (2004). "Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide." J Exp Med **199**(7): 947-57.

Jahng, A. W., I. Maricic, et al. (2001). "Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **194**(12): 1789-99.

Jahnsen, F. L., E. D. Moloney, et al. (2001). "Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge." Thorax **56**(11): 823-6.

Jayawardena-Wolf, J., K. Benlagha, et al. (2001). "CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain." Immunity **15**(6): 897-908.

Jiang, X., S. Kojo, et al. (2007). "Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance." Am J Transplant **7**(6): 1482-90.

Johnson, T. R., S. Hong, et al. (2002). "NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus." J Virol **76**(9): 4294-303.

Joyce, S., A. S. Woods, et al. (1998). "Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol." Science **279**(5356): 1541-4.

K

Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, et al. (1999). "Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells." J Immunol **162**(6): 3231-6.

Kang, S. J. and P. Cresswell (2002). "Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules." Embo J **21**(7): 1650-60.

- Kang, S. J. and P. Cresswell (2004). "Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells." Nat Immunol **5**(2): 175-81.
- Kasinrerk, W., T. Baumruker, et al. (1993). "CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol **150**(2): 579-84.
- Kawana, K., A. J. Quayle, et al. (2007). "CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity." J Biol Chem **282**(10): 7368-75.
- Kawano, T., J. Cui, et al. (1997). "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides." Science **278**(5343): 1626-9.
- Kim, E. Y., J. T. Battaile, et al. (2008). "Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease." Nat Med **14**(6): 633-40.
- Kinjo, Y., E. Tupin, et al. (2006). "Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria." Nat Immunol **7**(9): 978-86.
- Kinjo, Y., D. Wu, et al. (2005). "Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells." Nature **434**(7032): 520-5.
- Kitamura, H., K. Iwakabe, et al. (1999). "The natural killer T (NKT) cell ligand α -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells." J Exp Med **189**(7): 1121-8.
- Kliewer, S.A., J.M. Lenhard, et al. (1995). "A prostaglandin J_2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation." Cell **83**(5):813-819.
- Kliewer, S. A., S. S. Sundseth, et al. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ ." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4318-23.
- Koh, Y. I. and J. U. Shim (2010). "Association between sputum natural killer T cells and eosinophilic airway inflammation in human asthma." Int Arch Allergy Immunol **153**(3): 239-48.

Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes." Annu Rev Immunol **23**: 877-900.

Kronenberg, M. and L. Gapin (2002). "The unconventional lifestyle of NKT cells." Nat Rev Immunol **2**(8): 557-68.

L

La Cava, A., L. Van Kaer, et al. (2006). "CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators." Trends Immunol **27**(7): 322-7.

Lawton, A. P., T. I. Prigozy, et al. (2005). "The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **174**(6): 3179-86.

Le Naour, F., L. Hohenkirk, et al. (2001). "Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics." J Biol Chem **276**(21): 17920-31.

Lee, P. T., A. Putnam, et al. (2002). "Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis." J Clin Invest **110**(6): 793-800.

Lehmann, J.M., L.B. Moore LB et al (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ).". J Biol Chem **270**(22):12959-56.

Leslie, D. S., C. C. Dascher, et al. (2008). "Serum lipids regulate dendritic cell CD1 expression and function." Immunology **125**(3): 289-301.

Lisbonne, M., S. Diem, et al. (2003). "Cutting edge: invariant V α 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model." J Immunol **171**(4): 1637-41.

Liu, Y., R.D. Goff, et al. (2006). "A modified alpha-galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells." J Immunol Methods **312**:34-9.

Lolmede, K., L. Campana, et al. (2009). "Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways." J Leukoc Biol **85**(5): 779-87.

Longley, J., J. Kraus, et al. (1989). "Molecular cloning of CD1a (T6), a human epidermal dendritic cell marker related to class I MHC molecules." J Invest Dermatol **92**(4): 628-31.

M

MacHugh, N. D., A. Bensaid, et al. (1988). "Characterization of a bovine thymic differentiation antigen analogous to CD1 in the human." Scand J Immunol **27**(5): 541-7.

Manolova, V., M. Kistowska, et al. (2006). "Functional CD1a is stabilized by exogenous lipids." Eur J Immunol **36**(5): 1083-92.

Mariani, C. and M. Wolters-Arts (2000). "Complex waxes." Plant Cell **12**(10): 1795-8.

Martin, L. H., F. Calabi, et al. (1987). "Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9189-93.

Matangkasombut, P., G. Marigowda, et al. (2009). "Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1181-5.

Matangkasombut, P., M. Pichavant, et al. (2009). "Natural killer T cells and the regulation of asthma." Mucosal Immunol **2**(5): 383-92.

Matsuda, H., K. Takeda, et al. (2010). "Plasticity of invariant NKT cell regulation of allergic airway disease is dependent on IFN-gamma production." J Immunol **185**(1): 253-62.

Matsuda, J. L., L. Gapin, et al. (2003). "Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8395-400.

Matsuda, J. L., T. Mallevaey, et al. (2008). "CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system." Curr Opin Immunol **20**(3): 358-68.

Matsuura, A., Y. Hashimoto, et al. (1997). "Rat CD1 antigen: structure, expression and function." Transplant Proc **29**(3): 1705-6.

Mattner, J., K. L. Debord, et al. (2005). "Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections." Nature **434**(7032): 525-9.

- McKinley, L., J. F. Alcorn, et al. (2008). "TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice." J Immunol **181**(6): 4089-97.
- McNab, F. W., D. G. Pellicci, et al. (2007). "Peripheral NK1.1 NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts." J Immunol **179**(10): 6630-7.
- Mempel, M., B. Flageul, et al. (2000). "Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire." Am J Pathol **157**(2): 509-23.
- Mendez-Samperio, P. (2010). "Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease." Int J Infect Dis **14**(5): e366-71.
- Meyer, E. H., S. Goya, et al. (2006). "Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2782-7.
- Miller, M. M., C. Wang, et al. (2005). "Characterization of two avian MHC-like genes reveals an ancient origin of the CD1 family." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8674-9.
- Miura, S., K. Kawana, et al. (2010). "CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV." J Virol **84**(22): 11614-23.
- Miyamoto, K., S. Miyake, et al. (2001). "A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells." Nature **413**(6855): 531-4.
- Moody, D. B., B. B. Reinhold, et al. (1997). "Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells." Science **278**(5336): 283-6.
- Moody, D. B., T. Ulrichs, et al. (2000). "CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection." Nature **404**(6780): 884-8.
- Moody, D. B., D. C. Young, et al. (2004). "T cell activation by lipopeptide antigens." Science **303**(5657): 527-31.
- Morita, M., K. Motoki, et al. (1995). "Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice." J Med Chem **38**(12): 2176-87.

Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-12.

Mutalithas, K., J. Croudace, et al. (2007). "Bronchoalveolar lavage invariant natural killer T cells are not increased in asthma." J Allergy Clin Immunol **119**(5): 1274-6.

N

Nagai, T., O. Devergne, et al. (2003). "Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation." J Immunol **171**(10): 5233-43.

Nagarajan, N. A. and M. Kronenberg (2007). "Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide." J Immunol **178**(5): 2706-13.

Nagy L., P. Tontonoz, et al (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR- γ ." Cell **93**(2): 229-240.

Nencioni, A., F. Grunebach, et al. (2002). "Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma." J Immunol **169**(3): 1228-35.

Nieda, M., M. Okai, et al. (2004). "Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity." Blood **103**(2): 383-9.

Nieuwenhuis, E. E., T. Matsumoto, et al. (2002). "CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung." Nat Med **8**(6): 588-93.

O

Ochoa, M. T., S. Stenger, et al. (2001). "T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy." Nat Med **7**(2): 174-9.

P

- Paget, C., T. Mallevaey, et al. (2007). "Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids." Immunity **27**(4): 597-609.
- Park, A. Y., B. Hondowicz, et al. (2002). "The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*." J Immunol **168**(11): 5771-7.
- Park, J. J., S. J. Kang, et al. (2004). "Lipid-protein interactions: biosynthetic assembly of CD1 with lipids in the endoplasmic reticulum is evolutionarily conserved." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 1022-6.
- Pham-Thi, N., J. de Blic, et al. (2006). "Invariant natural killer T cells in bronchial asthma." N Engl J Med **354**(24): 2613-6; author reply 2613-6.
- Pichavant, M., S. Goya, et al. (2008). "Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17." J Exp Med **205**(2): 385-93.
- Pietschmann, P., J. Stockl, et al. (2000). "Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium." Scand J Immunol **51**(4): 377-83.
- Piggott, D. A., S. C. Eisenbarth, et al. (2005). "MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen." J Clin Invest **115**(2): 459-67.
- Porcelli, S., C. T. Morita, et al. (1992). "CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen." Nature **360**(6404): 593-7.
- kPrigozy, T. I., O. Naidenko, et al. (2001). "Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules." Science **291**(5504): 664-7.
- Prigozy, T. I., P. A. Sieling, et al. (1997). "The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules." Immunity **6**(2): 187-97.

R

- Raghuraman, G., Y. Geng, et al. (2006). "IFN-beta-mediated up-regulation of CD1d in bacteria-infected APCs." J Immunol **177**(11): 7841-8.

- Ranson, T., S. Bregenholt, et al. (2005). "Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **175**(2): 1137-44.
- Reis e Sousa (2004). "Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls." Semin Immunol **16**:27-34.
- Reynolds, C., J. Barkans, et al. (2009). "Natural killer T cells in bronchial biopsies from human allergen challenge model of allergic asthma." J Allergy Clin Immunol **124**(4): 860-2; author reply 862.
- Roark, J. H., S. H. Park, et al. (1998). "CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells." J Immunol **160**(7): 3121-7.
- Rodriguez-Rosales, M. P. and J.P. Donaire (1988). "Germination-induced changes in acyl lipids and free sterols of olive pollen." New Phytol **108**: 509-514.
- Rodriguez-Rosales, M. P., N. Ferrol, et al. (1990). "Cell wall acyl-lipids, proteins and polysaccharides in mature and germinated olive pollen." Rev Esp Fisiol **46**(4): 371-7.
- Ronger-Savle, S., J. Valladeau, et al. (2005). "TGFbeta inhibits CD1d expression on dendritic cells." J Invest Dermatol **124**(1): 116-8.
- Rosat, J. P., E. P. Grant, et al. (1999). "CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool." J Immunol **162**(1): 366-71.
- Russano, A. M., E. Agea, et al. (2008). "Complementary roles for lipid and protein allergens in triggering innate and adaptive immune systems." Allergy **63**(11): 1428-37.
- Russano, A. M., E. Agea, et al. (2006). "Recognition of pollen-derived phosphatidyl-ethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells." J Allergy Clin Immunol **117**(5): 1178-84.

S

- Sakuishi, K., S. Oki, et al. (2007). "Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation." J Immunol **179**(6): 3452-62.

- Salio, M., A. O. Speak, et al. (2007). "Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20490-5.
- Salomonsen, J., M. R. Sorensen, et al. (2005). "Two CD1 genes map to the chicken MHC, indicating that CD1 genes are ancient and likely to have been present in the primordial MHC." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8668-73.
- Sallusto, F., C. R. Mackay, et al. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.
- Sanchez, D. J., J. E. Gumperz, et al. (2005). "Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection." J Clin Invest **115**(5): 1369-78.
- Scanlon, S. T., S. Y. Thomas, et al. (2011). "Airborne lipid antigens mobilize resident intravascular NKT cells to induce allergic airway inflammation." J Exp Med **208**(10): 2113-24.
- Scharf, L., N. S. Li, et al. (2010). "The 2.5 Å structure of CD1c in complex with a mycobacterial lipid reveals an open groove ideally suited for diverse antigen presentation." Immunity **33**(6): 853-62.
- Schmieg, J., G. Yang, et al. (2005). "Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1127-32.
- Seino, K. and M. Taniguchi (2005). "Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes." J Exp Med **202**(12): 1623-6.
- Sen, Y., B. Yongyi, et al. (2005). "V alpha 24-invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement." J Immunol **175**(8): 4914-26.
- Shamshiev, A., A. Donda, et al. (1999). "Self glycolipids as T-cell autoantigens." Eur J Immunol **29**(5): 1667-75.
- Shamshiev, A., A. Donda, et al. (2000). "The alphabeta T cell response to self-glycolipids shows a novel mechanism of CD1b loading and a requirement for complex oligosaccharides." Immunity **13**(2): 255-64.
- Shamshiev, A., H. J. Gober, et al. (2002). "Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules." J Exp Med **195**(8): 1013-21.

- Shi, G. X., K. Harrison, et al. (2004). "Toll-like receptor signaling alters the expression of regulator of G protein signaling proteins in dendritic cells: implications for G protein-coupled receptor signaling." J Immunol **172**(9): 5175-84.
- Sieling, P. A., D. Chatterjee, et al. (1995). "CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens." Science **269**(5221): 227-30.
- Skold, M., X. Xiong, et al. (2005). "Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation." J Immunol **175**(6): 3584-93.
- Smed-Sorensen, A., M. Moll, et al. (2008). "IgG regulates the CD1 expression profile and lipid antigen-presenting function in human dendritic cells via FcgammaRIIa." Blood **111**(10): 5037-46.
- Smith, M. E., J. A. Thomas, et al. (1988). "CD1c antigens are present in normal and neoplastic B-cells." J Pathol **156**(2): 169-77.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, et al. (2002). "Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide." Blood **99**(4): 1259-66.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." J Exp Med **191**(4): 661-8.
- Spada, F. M., F. Borriello, et al. (2000). "Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells." Eur J Immunol **30**(12): 3468-77.
- Spinozzi, F., E. Agea, et al. (1998). "gamma delta T cells, allergen recognition and airway inflammation." Immunol Today **19**(1): 22-6.
- Sriram, V., S. Cho, et al. (2002). "Inhibition of glycolipid shedding rescues recognition of a CD1+ T cell lymphoma by natural killer T (NKT) cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8197-202.
- Sriram, V., W. Du, et al. (2005). "Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells." Eur J Immunol **35**(6): 1692-701.
- Steinman, R. M. (2003). "Some interfaces of dendritic cell biology." Apmis **111**(7-8): 675-97.

- Stenger, S., D. A. Hanson, et al. (1998). "An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin." Science **282**(5386): 121-5.
- Stenger, S., R. J. Mazzaccaro, et al. (1997). "Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection." Science **276**(5319): 1684-7.
- Stetson, D. B., M. Mohrs, et al. (2003). "Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function." J Exp Med **198**(7): 1069-76.
- Sugita, M., M. Cernadas, et al. (2004). "New insights into pathways for CD1-mediated antigen presentation." Curr Opin Immunol **16**(1): 90-5.
- Sugita, M., E. P. Grant, et al. (1999). "Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules." Immunity **11**(6): 743-52.
- Sugita, M., R. M. Jackman, et al. (1996). "Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MIIcCs." Science **273**(5273): 349-52.
- Sugita, M., S. A. Porcelli, et al. (1997). "Assembly and retention of CD1b heavy chains in the endoplasmic reticulum." J Immunol **159**(5): 2358-65.
- Szatmari, I., P. Gogolak, et al. (2004). "Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion." Immunity **21**(1): 95-106.
- Szatmari, I. and L. Nagy (2008). "Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function." Embo J **27**(18): 2353-62.
- Szatmari, I., A. Pap, et al. (2006). "PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells." J Exp Med **203**(10): 2351-62.

T

- Takahashi, T. and S. Strober (2008). "Natural killer T cells and innate immune B cells from lupus-prone NZB/W mice interact to generate IgM and IgG autoantibodies." Eur J Immunol **38**(1): 156-65.
- Takai, T., T. Kato, et al. (2005). "Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity." Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 944-52.

- Tanaka, H., C. E. Demeure, et al. (2000). "Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio." J Exp Med **192**(3): 405-12.
- Tanaka, Y., C. T. Morita, et al. (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." Nature **375**(6527): 155-8.
- Taniguchi, M., M. Harada, et al. (2003). "The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response." Annu Rev Immunol **21**: 483-513.
- Thomas, S. Y., C. M. Lilly, et al. (2006). "Invariant natural killer T cells in bronchial asthma." N Engl J Med **354**(24): 2613-6; author reply 2613-6.
- Thomas, W. R., B. J. Hales, et al. (2005). "Structural biology of allergens." Curr Allergy Asthma Rep **5**(5): 388-93.
- Traidl-Hoffmann, C., V. Mariani, et al. (2005). "Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization." J Exp Med **201**(4): 627-36.
- Tupin, E., Y. Kinjo, et al. (2007). "The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms." Nat Rev Microbiol **5**(6): 405-17.

V

- Van Kaer, L. (2004). "Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells." Immunol Res **30**(2): 139-53.
- Van Rhijn, I., A. P. Koets, et al. (2006). "The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d." J Immunol **176**(8): 4888-93.
- Van Rhijn, I., D. C. Young, et al. (2004). "CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13578-83.
- Venkataswamy, M. M. and S. A. Porcelli (2010). "Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells." Semin Immunol **22**(2): 68-78.
- Vieira, P. L., E. C. de Jong, et al. (2000). "Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction." J Immunol **164**(9): 4507-12.
- Vijayanand, P., G. Seumois, et al. (2007). "Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **356**(14): 1410-22.

Vincent, M. S., D. S. Leslie, et al. (2002). "CD1-dependent dendritic cell instruction." Nat Immunol **3**(12): 1163-8.

W

Winau, F., V. Schwierzeck, et al. (2004). "Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b." Nat Immunol **5**(2): 169-74.

Wingender, G., P. Rogers, et al. (2011). "Invariant NKT cells are required for airway inflammation induced by environmental antigens." J Exp Med **208**(6): 1151-62.

Wu, D., G. W. Xing, et al. (2005). "Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1351-6.

Wu, D. Y., N. H. Segal, et al. (2003). "Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells." J Exp Med **198**(1): 173-81.

Wun, K. S., N. A. Borg, et al. (2008). "A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR." J Exp Med **205**(4): 939-49.

X

Xiong S., N.A. Abumrad (2009). "Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction". Trends Endocrinol Metab **20**(2): 72-77.

Y

Yamamoto, H., Y. Okamoto, et al. (2007). "Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis." Allergy **62**(12): 1451-5.

Yamamoto, Y., K. Wakabayashi, et al. (1992). "Comparison of plasma levels of lipid hydroperoxides and antioxidants in hyperlipidemic Nagase analbuminemic rats, Sprague-Dawley rats, and humans." Biochem Biophys Res Commun **189**(1): 518-23.

Yu, K. O., J. S. Im, et al. (2005). "Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3383-8.

Yu, K. O. and S. A. Porcelli (2005). "The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy." Immunol Lett **100**(1): 42-55.

Yuan, W., A. Dasgupta, et al. (2006). "Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling." Nat Immunol **7**(8): 835-42.

Z

Zajonc, D. M., M. A. Elsliger, et al. (2003). "Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å." Nat Immunol **4**(8): 808-15.

Zeng, D., Y. Liu, et al. (2003). "Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus." J Clin Invest **112**(8): 1211-22.

Zeng, Z., A. R. Castano, et al. (1997). "Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove." Science **277**(5324): 339-45.

Zhou, D., C. Cantu, 3rd, et al. (2004). "Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins." Science **303**(5657): 523-7.

Zhou, D., J. Mattner, et al. (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." Science **306**(5702): 1786-9.

Zhu, M., R. K. Chin, et al. (2007). "Lymphotoxin beta receptor is required for the migration and selection of autoreactive T cells in thymic medulla." J Immunol **179**(12): 8069-75.

ANEXOS

ANEXOS

CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES

Beatriz Abós Gracia

Teléfono: 620148436

C/ Chorrillo Alta nº 41, 17

Correo electrónico: beatrizabos@yahoo.com

28860 Paracuellos de Jarama, Madrid

FORMACIÓN ACADÉMICA

Licenciada en Biología, especialidad Biología Molecular y Biotecnología (Universidad de Alcalá de Henares). Septiembre 2001–Junio 2006. 2005-2006: Beca Erasmus en Hertfordshire University, London, UK.

Doctorado

- Programa de Inmunología en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.
- Diploma de Estudios Avanzados (DEA) en Junio de 2008.

Idiomas

Año Académico (2005/6) en la Universidad de Hertfordshire, Londres, UK.

Título de 3º de la Escuela Oficial de Idiomas (2002) de Inglés.

Curso de Iniciación en Francés (2004) de la Escuela de Adultos.

Informática

Uso a nivel de usuario del paquete de Office e Internet. Programas que maneja: WinMDI, FlowJo, Statgraphics, Endnote, Photo-shop.

FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

“Instrument and software training of the ImmunoSpot Series 45 Micro ELISPOT Analyzer” C.T.L. (Europe GmbH), 2008.

Seminario de Formación en Protección Radiológica. Universidad Complutense, 2009.

Seminario: Real time PCR and massive DNA sequencing. Applications. Roche Applied Science. 2008

Congresos Anuales de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM), 2009 -2011.

Colaboradora en la traducción de algunos capítulos de libro de Fisiología (Ediciones Arial).

EXPERIENCIA PROFESIONAL

2006-2007. Becaria de Investigación. Proyecto: *"Papel de los linfocitos NKT en el rechazo de trasplantes de órganos sólidos"*. Facultad de Medicina (Área de Inmunología), Universidad Complutense de Madrid.

2007-2011. Becaria Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina (Área de Inmunología) de la UCM.

Docencia

- Formación de estudiantes y doctorandos.
- 120 horas de clases prácticas (2009-11) en la asignatura de Inmunología General (2º curso de Medicina).
- Colaboradora en las actividades de la X Semana de la Ciencia (2010).

Participación en proyectos de I + D

- Título: "Papel de los linfocitos NKT en el rechazo de trasplantes de órganos sólidos". Organismo Financiador: Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña.
- Título: "Estudio de la expresión de la molécula MR1 humana". Organismo Financiador: Banco Santander/UCM.
- Título: Ayudas a la investigación de grupos UCM. "Grupos de Inmunobiología linfocitaria". Organismo financiador: Universidad Complutense/Comunidad de Madrid.
- Título: "Antígenos lipídicos reconocidos por linfocitos T y su papel en la respuesta inmune de tipo Th1 y Th2". Organismo Financiador: FIS. Ministerio de Sanidad.

Contribución a Congresos

- "HUMAN MR1 (MHC-RELATED 1) IS EXPRESSED IN IGA-PRODUCING PLASMA CELLS IN HUMAN INTESTINAL MUCOSA" (Oral). M. Gómez del Moral, B. Gozalbo, B. Abós Gracia, P. Martín, C. Bellas and E. Martínez Naves. XXXII Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). Granada, 2007.
- "HUMAN MR1 SURFACE EXPRESSION (MHC-RELATED 1) NEEDS PROTEASOME INDEPENDENT LIGANDS" (Oral). B. Abós Gracia, M. Gómez

- del Moral, B. Gozalbo, Marta Cedenilla and E. Martínez Naves. XXXIII Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). Palma de Mallorca, 2008.
- "LIPIDS FROM *OLEA EUROPEAE* ARE RECOGNIZED AS ANTIGENS BY NKT CELLS THROUGH A CD1D-DEPENDENT PATHWAY" (Poster). B. Abós Gracia, M. Gómez del Moral, J. López and E. Martínez Naves. II European Congress of Immunology (ECI). Berlin, 2009.
 - "HUMAN MR1 (MHC Related I): CELL SURFACE EXPRESSION (DEPENDENCE OF TEMPERATURE AND PROTEASOME) AND TISSUE DISTRIBUTION" (Oral). M. Gómez del Moral, B. Abós Gracia, B. Gozalbo, J. López and E. Martínez Naves. II European Congress of Immunology (ECI). Berlín, 2009.
 - "IN VITRO EFFECT OF LENALIDOMIDE (REVLIMID®) OVER HUMAN CD1D⁺ ANTIGEN PRESENTING CELLS" (Oral). J. López, M. Gómez del Moral, B. Abós Gracia, E. Martínez Naves. XXXV Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). San Sebastián, 2010.
 - "HUMAN NKT CELLS RESPOND TO OLIVE POLLEN LIPIDS (*OLEA EUROPEAE*) TREATED-DCS THROUGH A CD1D-DEPENDENT PATHWAY" (Oral). B. Abós Gracia, M. Gómez del Moral, J. López, L. Castro, M.T. Villalba and E. Martínez Naves. XXXV Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). San Sebastián, 2010.
 - "MESOPOROUS SILICIOUS PARTICLES INCREASE ANTIGENIC CROSS-PRESENTATION BY MHC CLASS I IN HUMAN DENDRITIC CELLS" (Oral). M. Gómez del Moral, B. Abós Gracia, J. López, V. Viana, E. Matveyeva and E. Martínez Naves. XXXVI Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). Pamplona, 2011.
 - "IN VITRO EFFECT OF LENALIDOMIDE IN HUMAN DENDRITIC CELLS" (Poster). J. López, M. Gómez del Moral, B. Abós Gracia, E. Martínez Naves. XXXVI Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). Pamplona, 2011.
 - "LIPIDS FROM *OLEA EUROPEAE* INDUCE HUMAN NKT CELLS ACTIVATION THROUGH A CD1D-DEPENDENT PATHWAY" (Poster). B. Abós Gracia, M. Gómez del Moral, J. López, V. Viana, L. Castro, M.T. Villalba and E. Martínez Naves. XXXVI Congreso SEI (Sociedad Española de Inmunología). Pamplona, 2011.
 - "MESOPOROUS SILICON MICROPARTICLES ENHANCE MHC CLASS I CROSS-ANTIGEN PRESENTATION BY HUMAN DENDRITIC CELLS" (Póster). A. Jiménez Periañez, B. Abós Gracia, J. López Relaño, V. Viana

Huete, E. Matveyeva, E. Martínez Naves, M. Gómez del Moral. Materials of the 8th International Conference (Porous Semiconductors-Science and Technology). Málaga, 2012.

Publicaciones en revistas internacionales

- Gómez del Moral M., Abós B., Gozalbo-López B., López J., Martínez-Naves E. **“Human MR1 (MHC Related I): cell surface expression (dependence of temperature and proteasome) and tissue distribution”**. Medimond, International Proceedings, ECI Berlin, 61-65 (2009).
- Abós B., Gómez del Moral M., Gozalbo-López B., López-Relaño J., Viana V., Martínez Naves E. **“Human MR1 expression on the cell surface is acid sensitive, proteasome independent and increases after culturing at 26°C”**. Biochem Biophys Res Commun, 5; 411 (3):632-6 (2011).
- Abós-Gracia B., Gómez del Moral M., López-Relaño J., Viana-Huete V., Castro L., Villalba M., Martínez-Naves E. **“*Olea europea* pollen lipids activate iNKT cells by upregulating the CD1d expression on dendritic cells”**. J Allergy Clin Immunol. In press.

**OLEA EUROPAEA POLLEN LIPIDS ACTIVATE iNKT CELLS BY UPREGULATING THE CD1D
EXPRESSION ON DENDRITIC CELLS**

Beatriz Abós-Gracia¹ (BSc), Manuel Gómez del Moral² (PhD), Juan López-Relaño¹ (BMSc), Vanesa Viana-Huete¹ (BMSc), Lourdes Castro³ (BSc), Mayte Villalba³ (PhD) and Eduardo Martínez-Naves^{1*} (PhD).

From: ¹Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. Spain.

²Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. Spain.

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 1. Facultad de Químicas. Universidad Complutense de Madrid, Spain.

* Corresponding author: Dr. Eduardo Martínez-Naves, Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Avda. Complutense s/n. 28040 Madrid. Spain. Phone: 34-913941644, Fax: 34-913941641, E-mail address: emnaves@med.ucm.es

This work was supported by a grant from This work was supported by grants from Spanish Ministerio de Sanidad (Ref. FIS - PI080125) and Universidad Complutense de Madrid (Ref. 920631) to E.M.-N. B.A.-G. is the recipient of a predoctoral fellowship from Universidad Complutense de Madrid.

ABSTRACT

BACKGROUND. Invariant Natural Killer T (iNKT) cells recognize lipids presented by CD1d and have been implicated in the pathogenesis of allergic asthma. Recognition of plant pollen lipids by iNKT cells and its role in allergic responses are poorly defined. **OBJECTIVE.** Our goal was to investigate if iNKT cells can be activated by monocyte derived dendritic cells (DCs) exposed to lipidic antigens from *Olea europaea*

METHODS. DCs generated *in vitro* were exposed to *Olea europaea* pollen grains or lipids isolated from them. Expression of lipid presenting molecules (CD1) as well as maturation markers (HLA-DR, HLA-I, CD86 and CD80 molecules) on DCs was analyzed. iNKT cells activation after co-culture with DCs was evaluated by proliferation, cytokine production and cytotoxicity tests.

RESULTS. DCs up-regulated CD1d and CD86 expression and down-regulated CD1a after exposure to a whole extract of olive pollen lipids. CD1d and CD1a were regulated at transcriptional level in a peroxisome proliferator activated-receptor γ (PPAR γ) activation dependent manner. Polar lipids, diacylglycerols, free fatty acids and triacylglycerols isolated from pollen grains up-regulate CD1d. The increase of CD1d on the DCs cell surface induced by polar lipids was not regulated at the RNA level. iNKT cells efficiently recognize DCs treated with the different lipids isolated from the olive pollen grains.

CONCLUSIONS. Lipids from *Olea europaea* pollen up regulate CD1d and CD86 molecules on DCs which are then able to activate iNKT cells through a CD1d-dependent pathway.

KEY MESSAGES

Dendritic cells treated with lipids isolated from *Olea europaea* pollen grains up-regulated CD1d expression on the cell surface and are able to activate iNKT cells. This suggests that iNKT cells could be important in allergic responses.

CAPSULE SUMMARY

This study demonstrates that pollen lipids are able to activate human iNKT cells *in vitro* through the CD1d up-regulation. It is possible that pollen lipids-mediated iNKT cell stimulation has the potential to initiate, perpetuate or exacerbate allergic responses.

KEY WORDS

Pollen lipids, *Olea europaea*, DCs, iNKT cells, CD1d, PPAR γ

ABBREVIATIONS

Diacylglycerol (DG); Free Fatty Acid (FFA); Immature Dendritic Cell (iDC); Invariant Natural Killer T cell (iNKT cell); Peroxisome Proliferator Activated-Receptor γ (PPAR γ); Phospholipids (PLs); Triacylglycerol (TG)

INTRODUCTION

Natural killer T-cells (NKT) are nonconventional T lymphocytes that recognize lipidic antigens presented by CD1d molecules. Invariant NKT cells (iNKTs) are characterized by the use of a restricted TCR repertoire: V α 24/J α 18, pairing with preference with V β 11-chain². iNKT cells are cytotoxic, and they are able to secrete Th1 as well as Th2